

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“IDENTIFICACIÓN DE FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
OBTENIDAS DEL EXUDADO DE LA PIEL DE *Agalychnis spurrelli* (ANURA:
Hylidae)”**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciatura en Ciencias Químicas,
especialidad Química Analítica**

XIMENA ELIZABETH DILLON MAYA

Quito, 2012

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, especialidad Química Analítica, de la candidata Ximena Elizabeth Dillon Maya, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha: 26 de abril de 2012

Dra. Lorena Meneses Olmedo

DIRECTORA

AGRADECIMIENTO

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y a todos los docentes por el soporte científico brindado.

A la Dra. Lorena Meneses por permitirme realizar esta disertación bajo su dirección, su apoyo, disponibilidad, confianza y su capacidad para guiar con éxito no sólo el desarrollo de esta investigación, sino también en mi formación profesional. Además, de facilitar siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante la etapa experimental del presente trabajo.

A la Mtr. Myriam Rivera por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo dentro del proyecto “Caracterización de secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* (Anura: *Hylidae*)” y permitirme el uso de los equipos y materiales del Laboratorio de Citogenética de Anfibios. Muchas gracias por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación como investigadora.

Al Ing. Alexis Arias por su valiosa ayuda en el uso de materiales y equipos para la obtención de los resultados finales del presente trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Citogenética de Anfibios, por su colaboración en la colección de secreciones cutáneas, sin las cuales no hubiera sido posible llevar a cabo este estudio, así como su participación activa e intercambio de conocimientos en general, fue de gran ayuda para estar al tanto de toda la investigación realizada en el proyecto.

A mi familia porque gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar muchos de mis sueños.

A Jorge por la oportunidad de existir, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional.

A mis queridos amigos, Tefi, Michu, Andre, Quique, Santy, Sofi, Sebas, Geno, y Pame, quiero expresar un profundo agradecimiento por su ayuda, apoyo y aliento durante toda la carrera.

Comprender las cosas que nos rodean es
la mejor preparación para comprender
las cosas que hay mas allá.
Hypatia.

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO I.....	8
1. MARCO TEÓRICO.....	8
1.1. Anfibios.....	8
1.1.1. Características Generales.....	8
1.1.2. Clasificación.....	9
1.1.3.Hábitat.....	9
1.1.4. Morfología.....	10
1.1.5.Importancia.....	11
1.2. Rana <i>Agalychnis spurrelli</i> (Anura: <i>Hylidae</i>).....	12

1.2.1. Descripción.....	12
1.2.2. Distribución y Hábitat.....	14
1.2.3. Reproducción.....	15
1.2.4. Estado de Conservación y amenazas de la especie.....	15
1.3. Péptidos.....	16
1.3.1. Características Químicas.....	16
1.3.2. Péptidos con actividad antimicrobiana.....	19
1.3.2.1. Síntesis.....	20
1.3.2.2. Actividad Biológica.....	21
1.3.2.3. Propiedades.....	21
1.3.2.4. Clasificación de los PAM.....	23
1.3.2.5. Mecanismo de acción.....	28
 CAPÍTULO II.....	 32
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1. Colección del extracto.....	33
2.1.1. Equipos.....	33
2.1.2. Materiales.....	33
2.1.3. Reactivos.....	34
2.1.4. Procedimiento.....	34
2.2. Liofilización.....	35
2.2.1. Equipos.....	36

2.2.2. Materiales.....	36
2.2.3. Reactivos.....	37
2.2.4. Procedimiento.....	37
2.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).....	39
2.3.1. Equipos.....	41
2.3.2. Materiales.....	42
2.3.3. Reactivos.....	42
2.3.4. Procedimiento.....	42
2.3.5. Preparación de reactivos.....	43
2.3.6. Preparación de muestras.....	44
2.3.7. Análisis Cromatográfico.....	44
2.4. Ensayos Microbiológicos.....	46
2.5. Liofilización de Fracciones.....	46
2.5.1. Equipos.....	46
2.5.2. Materiales.....	46
2.5.3. Reactivos.....	47
2.5.4. Procedimiento.....	47
2.6. Espectrofotometría de Infrarrojos con Transformadas de Fourier (FT-IR).....	48
2.6.1. Equipos.....	50
2.6.2. Materiales.....	50
2.6.3. Reactivos.....	50
2.6.4. Procedimiento.....	50

CAPÍTULO III.....	53
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.1. Extracción Cutánea de <i>Agalychnis spurrelli</i>	53
3.2. Liofilización de los extractos.....	55
3.3. Análisis Cromatográfico.....	57
3.3.1. Optimización del método.....	57
3.3.2. Obtención de Fracciones.....	59
3.4. Análisis Microbiológico.....	61
3.5. Liofilización de las fracciones.....	65
3.6. Análisis Espectrofotométrico.....	69
 CAPÍTULO IV.....	 72
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	72
4.1. CONCLUSIONES.....	72
4.2. RECOMENDACIONES.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS.....	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Copia del registro de extracciones en los especímenes <i>Agalychnis spurrelli</i> que se realizaron para el presente estudio.....	54
Tabla 2. Pesos obtenidos de las liofilizaciones de las secreciones cutáneas.....	57
Tabla 3. Condiciones de operación optimizadas para la separación del extracto crudo de ranas.....	58
Tabla 4. Fracciones efectivas para la inhibición del crecimiento de bacterias en proporción 30Péptido/70Bacteria.....	63
Tabla 5. Fracciones efectivas para la inhibición del crecimiento de bacterias en proporción 25Péptido/75Bacteria.....	64
Tabla 6. Peso total obtenido de Fracciones efectivas para la inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> serotipo Enteritidis, y <i>Staphylococcus aureus</i>	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución total de especies de anfibios a nivel mundial.....	10
Figura 2. Macho adulto <i>Agalychnis spurrelli</i>	13
Figura 3. <i>Agalychnis spurrelli</i> en reposo entre la vegetación.....	14
Figura 4. Oviposición.....	15
Figura 5. Estructura general de un α -aminoácido.....	17
Figura 6. Formación del enlace peptídico.....	18

Figura 7. Modelos estructurales de la clasificación de los PAM (2D-RMN).....	27
Figura 8. Ilustración del modelo de barril y carpeta para la inserción del péptido.....	31
Figura 9. Diagrama general del proceso aplicado en la investigación.....	32
Figura 10. Esquema de un equipo de Liofilización.....	36
Figura 11. Método para la liofilización de secreciones cutáneas.....	39
Figura 12. Esquema de un cromatógrafo líquido de alta eficiencia.....	40
Figura 13. Columna de fase inversa.....	41
Figura 14. Gradiente de elución utilizada en la separación.....	45
Figura 15. Esquema de un espectrómetro FT-IR de un sólo haz.....	48
Figura 16. Parámetros utilizados para la corrida de los espectros en IR.....	52
Figura 17. Gráfico del proceso de liofilización de secreciones cutáneas.....	56
Figura 18. Cromatograma del Blanco, solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,12% (V/V).....	59
Figura 19. Cromatograma del extracto sólido de la rana <i>Agalychnis spurrelli</i> SC 25349 en solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,12% (V/V).....	60
Figura 20. Cromatograma del extracto sólido de varias ranas <i>Agalychnis spurrelli</i> en solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,12% (V/V).....	61
Figura 21. Gráfico del proceso de liofilización de fracciones obtenidas por HPLC.....	66
Figura 22. Gráfico del proceso de liofilización incompleto de fracciones obtenidas por HPLC.....	67
Figura 23. Espectro del Blanco, Bromuro de Potasio grado espectrométrico (Background).....	69
Figura 24. Espectro de la Fracción No.44, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.....	70

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Series de campo correspondiente a los especímenes de <i>Agalychnis</i> <i>spurrelli</i> empleados para la obtención de secreciones cutáneas.....	82
ANEXO 2. Copia del permiso de colección de anfibios para el proyecto en el que se desarrolló la investigación por un año calendario (2007-2008).....	83
ANEXO 3. Copia del permiso de colección de anfibios para el proyecto en el que se desarrolló la investigación por un año calendario (2009-2010).....	85
ANEXO 4. Cromatogramas de las corridas realizadas por HPLC/UV-Vis de secreciones cutáneas de <i>Agalychnis spurrelli</i>	87
ANEXO 5. Espectros de fracciones con actividad antimicrobiana obtenidas por Espectrofotometría de Infrarrojos con Transformadas de Fourier (FT-IR).....	106

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue identificar estructuralmente por Espectrofotometría de Infrarrojos, fracciones que presentan actividad antimicrobiana que fueron obtenidas a partir de secreciones cutáneas extraídas de anuros de la especie *Agalychnis spurrelli*, anfibios colectados en la zona noroccidente del Ecuador.

Se efectuaron extracciones de secreciones cutáneas a los especímenes disponibles, con la ayuda de un equipo estimulador transcutáneo para anfibios, después se lavó la superficie dorsal de cada rana con agua desionizada. Una vez recolectadas las soluciones, se procedió a realizar la liofilización de las secreciones, consiguiendo un polvo fino blanquecino, sólido que posteriormente fue separado por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, donde se obtuvieron fracciones de acuerdo a su tiempo de retención. A continuación, cada fracción se analizó en diluciones con distintas cepas y aislados de tres tipos de bacterias en cuatro proporciones y por triplicado, técnica con la que se determinó que a partir de la fracción número 38 hasta la 70 son efectivas en menor proporción para la inhibición del crecimiento bacteriano.

Luego de obtener un volumen adecuado de cada fracción efectiva, se procedió a liofilizar nuevamente, y con los sólidos obtenidos se elaboraron pastillas con bromuro de potasio para su lectura por Espectrofotometría de Infrarrojos. Se obtuvieron espectros en los que se constató que los compuestos activos de las secreciones cutáneas son péptidos, ya que presentaron bandas características de una amida secundaria, dando una asignación provisional de una estructura secundaria del tipo β laminar.

Con este estudio se sientan bases para investigaciones futuras que conlleven a la secuenciación de cada fracción, la especificación de masas moleculares, y la determinación de estructuras terciarias, pasos necesarios para establecer la posibilidad de su síntesis.

Palabras clave: *Agalychnis spurrelli*, liofilización, fracciones con actividad antimicrobiana, cromatografía líquida de alta eficiencia, espectrofotometría de infrarrojos.

ABSTRACT

The main goal of this work was the structural identification by Infrared Spectrophotometry, fractions that present antimicrobial activity which had been obtained from cutaneous secretions extracted from anurans of the specie *Agalychnis spurrelli*, amphibians collected at the northwest zone of Ecuador.

It has been staged extractions of cutaneous secretions to available specimens with help of a transcutaneal stimulating equipment designed for amphibians. Afterwards, it has been washed dorsal surface of each with deionized water. Once all the solutions were collected, it has been proceeded to perform the lyophilization of the secretions, obtaining a solid fine white powder which on the next step was separated with High Performance Liquid Chromatography, obtaining fractions regarding its retention time. Later, each fraction has been analyzed on dilutions with distinct strains and isolated of three kinds of bacteria on four portions, by three times, technique used to determine that starting from fraction 38 to 70 are effective in less proportion for inhibition of bacterial growth.

After obtaining an adequate volume of each effective fraction, lyophilization has been proceeded once again, and with all the obtained solids, pills has been elaborated with potassium bromide for the reading by Infrared Spectrophotometry. Spectrograms have been obtained in which it was verified that active compounds of cutaneous secretions are peptides due to the fact that characteristic bands of a secondary amide, giving a provisional assignment of a secondary structure of β sheet type.

With this study foundations are made for further investigations which lead to the sequencing of each fraction, specification of molecular masses, and determination of tertiary structures, necessary steps to establish the possibility of its synthesis.

Key words: *Agalychnis spurrelli*, lyophilization, antimicrobial activity fractions, High Performance Liquid Chromatography, Infrared Spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos son sistemas abiertos que se encuentran constantemente expuestos al medio ambiente, lo cual implica enfrentar el riesgo constante de adquirir infecciones, por lo que han desarrollado mecanismos de defensa que conforman el sistema inmune para combatir cualquier tipo de amenaza.

Entender a la biodiversidad como una fuente formidable de recursos medicinales ha impulsado numerosos estudios en los anfibios a nivel mundial en los últimos 50 años, ya que sus secreciones contienen numerosos compuestos con propiedades neuroquímicas y medicinales que resultan de gran interés para los científicos, por lo que en el 2004 el laboratorio de Citogenética de Anfibios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador inicia un proyecto de investigación en el que se realizaron pruebas en distintas secreciones de anfibios de las familias: Hylidae, Dendrobatidae, Ranidae, para la determinación de la presencia de compuestos farmacológicos [1]. Se detecta la presencia de alcaloides en la Familia Dendrobatidae y en el 2006 se realiza el análisis de las muestras purificadas por Cromatografía de Gases con detector de Masas [2].

En el 2007 el laboratorio emprende un estudio amplio de secreciones de anfibios ecuatorianos con pruebas de susceptibilidad en bacterias patógenas [3] y se define la actividad antimicrobiana en secreciones cutáneas provenientes de *Agalychnis spurrelli* con una inhibición en un número mayor de aislados resistentes a antibióticos de uso terapéutico. En 2009 se desarrolla una serie de ensayos con las secreciones de esta especie para comprobar la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos y se demuestra actividad antifúngica con un efecto inhibitorio positivo [4].

A partir de 2010, se han realizado pruebas con otro tipo de levaduras patógenas, células cancerígenas y la separación de la secreción en fracciones por Cromatografía líquida de alta eficiencia para su análisis microbiológico en bacterias patógenas [5] así como el inicio del análisis químico en cada fracción con actividad antimicrobiana.

A pesar de que los trabajos anteriores al presente han reportado que los compuestos presentes son péptidos, no se ha especificado ningún método para la identificación cualitativa de éstos, por lo que el presente estudio se enfoca en la identificación de las fracciones obtenidas por HPLC de secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* que presentaron actividad antimicrobiana, por Espectrofotometría de Infrarrojos (FT-IR), con el fin de dar una base química para proseguir con un estudio más minucioso de los compuestos presentes.

Por consiguiente, se plantea a continuación como objetivo principal de este trabajo el identificar estructuralmente fracciones con actividad antimicrobiana obtenidas del exudado de la rana ecuatoriana *Agalychnis spurrelli* utilizando Espectrofotometría de Infrarrojos. Como objetivos específicos se propone optimizar el método de purificación/separación del extracto crudo de la rana, determinar los grupos funcionales de las fracciones con mayor actividad antimicrobiana, y comparar los espectros obtenidos de cada fracción y establecer diferencias entre éstas.

A continuación se muestra el contenido de cada capítulo para poder guiar de mejor manera al lector a través de este trabajo:

En el Capítulo I, se encuentra una breve descripción de los anfibios, de la especie en estudio *Agalychnis spurrelli*, y una revisión bibliográfica del principio activo posible, los péptidos, su acción antimicrobiana, tipos y mecanismos de acción.

En el Capítulo II, se detalla el principio teórico de cada técnica utilizada, los equipos, materiales, reactivos empleados y los procedimientos aplicados en la fase experimental.

En el Capítulo III, se presentan los resultados obtenidos del trabajo, los cuales son sujetos a discusión a través de los datos experimentales y la interpretación de espectros.

Finalmente, en el Capítulo IV se establecen las conclusiones y recomendaciones procedente del desarrollo investigativo.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Anfibios

1.1.1. Características Generales

Los anfibios son animales ectotérmicos, es decir que dependen de una fuente de calor externa para mantener la temperatura de sus cuerpos. Son animales de sangre fría que tienen la piel típicamente desnuda, lisa y viscosa, la misma que sirve tanto de órgano respiratorio como de aparato secretor [6]. A diferencia del resto de los vertebrados, se distinguen por sufrir una transformación drástica en la anatomía y fisiología de su cuerpo durante su desarrollo, denominada metamorfosis [6, 7].

Poseen una increíble variedad de diseños, tamaños, y colores con gran multiplicidad de rayas y lunares. Se confunden con el entorno para camuflarse o bien están vivamente coloreados para avisar a sus depredadores que son venenosos. El color también puede ayudar a absorber o reflejar el calor, o ser un atractivo sexual, y puede variar con la humedad, la temperatura y el estrés.

Los anfibios son el reflejo de un gran paso evolutivo de los vertebrados para conquistar el medio terrestre. Si bien son animales terrestres, ellos siguen ligados al agua por sus mecanismos de reproducción y desarrollo, para así poder completar eficazmente su ciclo de vida. Pero, se observa en éstos una tendencia a independizarse del medio acuático, evidenciada por la evolución morfológica en extremidades, cinturas pélvica y pectoral como caracteres relevantes [8-12].

La alimentación se basa en vegetales durante la fase larvaria, y en la fase adulta son grandes consumidores de artrópodos terrestres, principalmente insectos, lo cual contribuye a regular las poblaciones de éstos. También se alimentan de otros invertebrados ya que las presas pueden variar según el tamaño de los anfibios [7].

1.1.2. Clasificación [13, 14]

Los anfibios pertenecen a la familia *Amphibia*, que está dividida en tres subclases de las cuales dos están extintas, y la tercera que incluye a todas las especies de anfibios vivientes, *Lissamphibia*, que se clasifica en 3 grupos: *Gymnophiona* (Cecílicos), *Caudata* (Salamandras), y *Anura* (Sapos y Ranas).

1.1.3. Hábitat

Se conocen más de 6500 especies de anfibios que habitan todos los continentes, excepto en las regiones árticas y en los desiertos más áridos. Algunas especies viven la mayor parte de su vida adulta en el agua, mientras que otras son estrictamente terrestres [8].

En la Figura 1 se puede observar el número de especies de anfibios por país, cada color representa el rango en el que éste se encuentra, dando así una perspectiva de su distribución a nivel mundial.

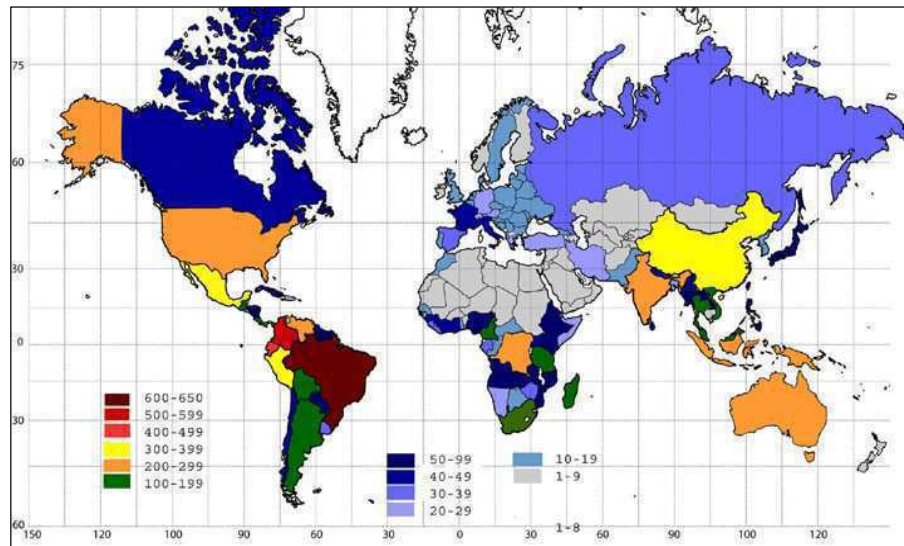


Figura 1. Distribución total de especies de anfibios a nivel mundial

El Ecuador posee 479 especies descritas formalmente, de las cuales 191 especies (40%) son endémicas. Es el tercer país con mayor diversidad de anfibios después de Brasil y Colombia, pero el primero si se considera su número de especies por unidad de superficie ($0.017 \text{ especies/km}^2$). Actualmente, no menos del 31% (146 especies) de anfibios ecuatorianos están en categorías de riesgo de extinción y entre ellos 11 especies estarían extintas [15, 16].

1.1.4. Morfología

Los anuros y los caudatos presentan, por lo general, cuatro extremidades, mientras que los cecílicos carecen de ellas y la locomoción la efectúan por ondulaciones horizontales del cuerpo. La boca alcanza gran tamaño y, en ocasiones, va provista de pequeños dientes débiles. Son animales engullidores, puesto que introducen en su tubo digestivo a sus presas sin fragmentación previa [7].

Los anfibios pueden realizar el intercambio gaseoso a través de tres superficies: piel, boca y pulmones. El grado de utilización de una u otra superficie respiratoria depende del grupo, aunque éstos no son excluyentes, supone un aporte suplementario al intercambio gaseoso; la mayor parte del proceso respiratorio se efectúa a través de la piel debido a que las zonas de la cavidad bucal y de los pulmones son de estructura muy sencilla y actúan sólo como complemento de la respiración cutánea [17].

Piel

La piel es una estructura desnuda, sencilla, permeable al agua, muy vascularizada, provista de una multitud de glándulas cutáneas, que llevan a cabo una serie de funciones vitales en los anfibios al protegerlos contra la abrasión y agentes patógenos. Muchos anfibios poseen glándulas, conocidas como *glándulas granulares*, las cuales secretan un moco líquido e incoloro que previene la desecación, mantiene el equilibrio iónico, además de la producción de compuestos biológicamente activos y de toxicidad variable tales como aminas biogénicas, alcaloides o péptidos [7].

La piel de los anfibios se encarga de un conjunto de mecanismos vitales tales como la respiración cutánea, regulación del agua, contribución directa al cambio de pigmentaciones en algunas especies, y el control de la temperatura corporal. Adicionalmente, la piel actúa muchas veces como un medio de defensa o disuasivo contra los depredadores, al poseer una serie de glándulas venenosas o pigmentaciones de advertencia [18, 19].

1.1.5. Importancia

Los anfibios cumplen un rol fundamental en los ecosistemas, debido al transporte de energía y nutrientes desde el medio acuático al terrestre. Las lluvias y los cursos de agua

arrastran los nutrientes de los suelos hacia los cuerpos de agua, donde se reproducirán los anfibios; dichos nutrientes favorecerán el desarrollo del plancton animal y vegetal, además de la vegetación acuática mayor que servirá de alimento a las larvas de anfibios. Éstas, al finalizar su desarrollo y abandonar el medio acuático, llevarán al medio terrestre las sustancias elaboradas por la fotosíntesis de las plantas acuáticas, abonadas por los nutrientes originalmente lavados de los suelos, donde los dejarán al morir o al ser consumidos por los depredadores [20].

Además, los anfibios han impulsado numerosos estudios alrededor del mundo, ofreciendo una fuente formidable de recursos medicinales. En el caso de las ranas, sus secreciones resultan de gran interés para investigaciones neuroquímicas y farmacológicas [20, 21].

1.2. *Rana Agalychnis spurrelli* (Anura: *Hylidae*)

1.2.1. Descripción [13, 22, 23]

Anuro medianamente grande de costumbres arborícolas de la familia *Phyllomedusinae*, fue descrita por primera vez por G.A. Boulenger en 1913. Se distingue por sus ojos marrón oscuro con pupilas verticales, su dorso es verde ligeramente rugoso con unas distintivas manchas blancas bordeadas de negro (verrugas pustulares), vientre blanco, extremidades delgadas de color uniformemente amarillo, anaranjado, rosa pálido o morado pálido, sin barras oscuras.

Son animales aptos para la marcha arbórea con discos en las falanges y amplias membranas interdigitales, lo que le distingue de otras especies del género *Agalychnis*, las cuales le permiten adherirse a superficies lisas y mojadas facilitándole la escalada.

En la Figura 2 se muestra la foto de un espécimen macho adulto en su hábitat natural con una coloración rosa pálido en los flancos y extremidades, y sus verrugas pustulares características.



Figura 2. Macho adulto *Agalychnis spurrelli*

Pertenece a la familia de las ranas mono, familia de anuros arborícolas neotropicales de actividad crepuscular y nocturna, sus extremidades son aptas para asir ramas, lo que les confiere unas características muy diferenciadas de desplazamiento, lento y muy marcado. Es una especie con métodos inusuales de locomoción, se mueve a través de enredaderas y ramas con una mano, y simula un paracaídas al saltar y al moverse horizontalmente.

Los saltos de paracaidismo se llevan a cabo mediante la difusión de las extremidades, manteniendo un ángulo de pendiente hasta 45° de su vertical para distancias considerablemente largas.

En la Figura 3 se puede observar como la rana permanece durante el día camuflada entre la vegetación, con una postura típica de reposo en la que las extremidades están pegadas al

cuerpo, de tal manera que simulan ser una protuberancia de la misma hoja. Esta postura les ayuda a no perder la humedad corporal y permanecer ocultas de sus principales depredadores.



Figura 3. *Agalychnis spurrelli* en reposo entre la vegetación

1.2.2. Distribución y Hábitat

Esta especie habita en las tierras bajas húmedas tropicales y subtropicales, así como las porciones más bajas de las zonas de bosques muy húmedos del sureste y el suroeste de Costa Rica, a través de Panamá, las tierras bajas del Pacífico de Colombia y el noroeste de Ecuador, en alturas que van desde 15 hasta 750m. También se encuentra en el interior de las marismas intermitentes de agua dulce y las piscinas más pequeñas de 8 hectáreas.

El área de ocupación de esta especie en Ecuador corresponde a un polígono de 19.600km², mientras que su rango de distribución en América se extiende aproximadamente 1.900km lineales desde el suroccidente de Costa Rica hasta el centro occidente de Ecuador.

1.2.3. Reproducción

Las hembras depositan masas de huevos en el follaje frondoso (oviparidad externa), las masas más densas se encuentran entre 1.5 y 3m sobre el agua. Se han observado algunos grupos de ranas hasta los 8m. de altura y en algunos arbustos bajos se han encontrado extensamente cubiertos de masas de huevos, generalmente depositados en la parte superior de la hoja, teniendo una variación en tamaño entre 14 a 67 huevos cada una, abriéndose seis días después de la oviposición. La Figura 4 muestra la imagen de una pareja de anuros de la especie luego de que la hembra colocó las masas de huevos sobre la hoja.



Figura 4. Oviposición

1.2.4. Estado de Conservación y amenazas de la especie

El estado actual de la Lista Roja de esta especie se considera de Preocupación Menor (LC por sus siglas en inglés). La tendencia de la población de la especie está disminuyendo, pero no a un ritmo lo suficientemente rápido para tener derecho a su inclusión en una categoría más amenazada.

Las posibles amenazas incluyen la pérdida de hábitat debido al desarrollo agrícola, los cultivos ilícitos, la tala y los asentamientos humanos. Se requiere mayor investigación sobre tendencias demográficas, así como el establecimiento de nuevas áreas protegidas.

Las cinco especies de *Agalychnis* (*annae* A., *A. callidryas*, *A. moreletii*, *A. saltator*, y *A. spurrelli*) acaban de recibir protección de la CITES (siglas en inglés de la Convención de Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres), el 21 de marzo de 2010.

1.3. Péptidos

1.3.1. Características Químicas

Un péptido es cualquier combinación de aminoácidos en la cual el grupo alfa amino de un aminoácido está unido al grupo α carboxílico de otro aminoácido mediante un enlace amida. El número de aminoácidos puede oscilar entre dos y cien, pero sin que su peso molecular sea mayor que 5000 Dalton, puesto que la molécula se consideraría una proteína [24-26].

En un péptido se distinguen dos regiones, la cadena principal o esqueleto y las cadenas laterales. La cadena principal es la unidad repetitiva básica, común en todos los péptidos de igual longitud. Las cadenas laterales se proyectan a partir del esqueleto y son los responsables de las propiedades químicas del péptido [27-30]. Los enlaces amida formados en los péptidos siempre implican los grupos ácidos α amino y α carboxílico, y nunca de las cadenas laterales, es decir que, para la formación de un péptido se requiere de α aminoácidos los cuales tienen al grupo ácido y al grupo amino unidos al mismo átomo de carbono [27, 28] como se muestra en la Figura 5.

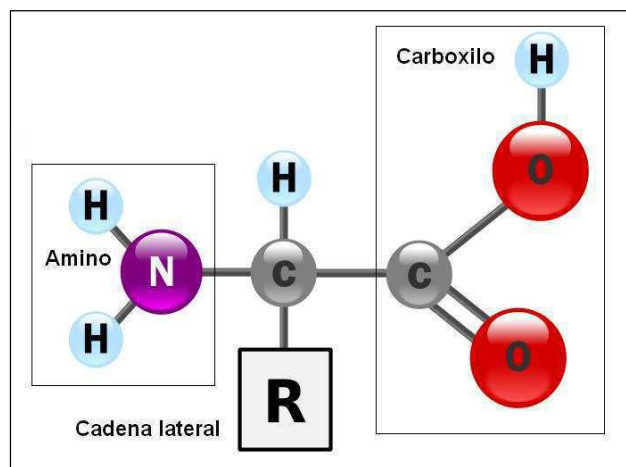


Figura 5. Estructura general de un α -aminoácido

El enlace entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el nitrógeno del aminoácido siguiente en la cadena peptídica también recibe el nombre de enlace peptídico o unión peptídica. Los aminoácidos que han sido incorporados en péptidos se denominan residuos de aminoácidos. A medida que se van agregando más residuos de aminoácidos, se forma el esqueleto común de todas las moléculas peptídicas [30]. El orden en que se unen los residuos de aminoácidos en un péptido es la secuencia de aminoácidos, estructura primaria de ese péptido. Las diferencias en las propiedades químicas y fisiológicas de los péptidos resultan de las diversas secuencias de aminoácidos que pueden existir.

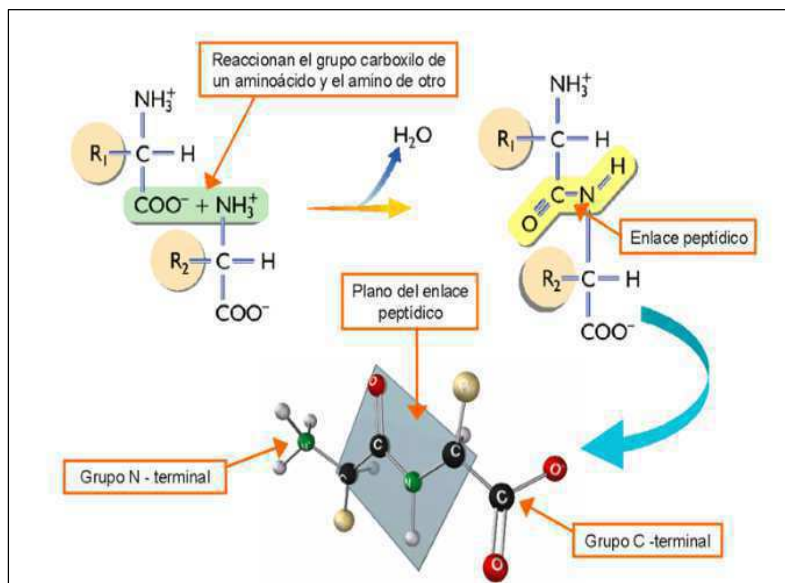


Figura 6. Formación del enlace peptídico

En la Figura 6 se grafica el proceso de formación del enlace peptídico, en el cual se unen dos α -aminoácidos, se produce la unión del grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino del otro y como resultado se obtiene la liberación de una molécula de agua y la formación del péptido.

El enlace peptídico ($-\text{CO}-\text{NH}-$) se representa normalmente como un enlace sencillo. La característica principal de este enlace radica en que no permite el giro de los elementos unidos a él por ser un enlace rígido. La rigidez de este enlace se debe a que los electrones del doble enlace, que posee el carbono del grupo carboxilo con el oxígeno, se movilizan hacia la unión entre el carbono carboxilo y el nitrógeno del grupo amina. Como el Nitrógeno es menos electronegativo que el Oxígeno, el enlace C-O tiene un 60% de carácter de doble enlace mientras que el enlace C-N tiene un 40%. Por tanto, el enlace peptídico presenta características intermedias entre las de un enlace sencillo y uno doble.

Esta teoría se confirma por el hecho de que las distancias interatómicas medidas en el enlace C-O y en el enlace C-N son intermedias entre las del enlace sencillo y las del doble enlace. El carácter parcial de doble enlace impide la libre rotación en torno al enlace que conecta los átomos de Carbono y de Nitrógeno, por lo tanto, las posibilidades conformacionales de los péptidos son limitadas.

Los péptidos sólo pueden cambiar de conformación mediante rotación en torno a los enlaces sencillos de los Ca tetraédricos (con hibridación sp^3), pero no por rotación en torno al enlace C-N peptídico (átomos con hibridación sp^2) [30].

1.3.2. Péptidos con actividad antimicrobiana [31]

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son moléculas evolutivamente conservadas que forman parte del sistema inmune de muchos organismos, representan la primera línea de defensa del hospedero contra agentes patógenos y fueron inicialmente encontrados en invertebrados.

Gracias a la diferente composición bioquímica de sus estructuras, los péptidos actúan como armas defensivas en un amplio mecanismo de acción e interacción, lo cual dificulta el desarrollo de mutantes resistentes de microorganismos, la inhibición del crecimiento de bacterias, hongos, protozoos, células malignas e incluso virus como VIH, herpes simples, y virus de la estomatitis vesicular.

El entendimiento de cómo, cuándo, y dónde ocurre su función y el espectro de acción, ha creado un considerable interés que puede llevar al desarrollo de novedosos agentes terapéuticos, especialmente, en el contexto de la creciente resistencia a los antibióticos

convencionales. Algunos péptidos antimicrobianos están siendo desarrollados para su uso como antibióticos tópicos o como preservantes en la industria.

1.3.2.1. Síntesis

Las secreciones peptídicas constituyen la principal arma de defensa contra microorganismos patógenos que crecen en la piel de los anuros. Ésta al ser desnuda y estar permanentemente humectada, representa un ambiente favorable para el crecimiento de bacterias patógenas, por lo que los anuros al sentirse amenazados, sintetizan los péptidos en corto tiempo, a un costo metabólico bajo y fácilmente almacenados en grandes cantidades dentro de la célula.

La inducción del proceso de síntesis de los péptidos antimicrobianos es prevalente en insectos, se ha estudiado particularmente en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y se ha observado en vertebrados y plantas. Además de la regulación por síntesis a un nivel adicional de control y especificidad, se da en la acumulación de estos péptidos en células efectoras, como granulocitos, neutrófilos y macrófagos, en mamíferos y hemocitos en insectos. Estas células tienen mecanismos que controlan la liberación de gránulos de este tipo de sustancias, dependiendo de los estímulos específicos [32].

En los invertebrados, los péptidos antimicrobianos se caracterizan por su rápida síntesis y secreción hacia la hemolinfa después de una infección microbiana y se ha encontrado que sus genes se encuentran principalmente activos en el cuerpo graso y los hemocitos. En los vertebrados, la síntesis de los péptidos antimicrobianos es constitutiva o se puede inducir por respuesta inflamatoria, mediadas por citocinas y macromoléculas microbianas. En el caso de los anuros, la síntesis de péptidos se da por parte de glándulas granulares presentes

en su piel al producirse daño o estrés y protegen al hospedero de la invasión de microorganismos patógenos.

1.3.2.2. Actividad Biológica

Evolutivamente, estos péptidos se han desarrollado por procesos de duplicación, divergencia y presión selectiva, dada la interacción de cada especie con su ambiente y patógenos específicos. Particularmente, las glándulas dermales pueden sintetizar y guardar un espectro amplio de agentes antimicrobiales, de 10-50 residuos en longitud, estos son liberados en la capa externa de la piel proveyendo así una defensa efectiva y rápida hacia microorganismos potencialmente dañinos para el hospedero.

En los hospederos anfibios, la actividad antimicrobiana es asociada a un grado considerable de polimorfismo peptídico. Los anfibios de diferentes especies secretan distintos repertorios de entre 6 a 20 péptidos antimicrobiales, con un tamaño, carga, hidrofobicidad, conformación y mecanismo de acción diferente, incluso no se ha encontrado dos especies con un patrón similar de péptidos antimicrobiales [31-33].

1.3.2.3. Propiedades

Son péptidos de bajo peso molecular (usualmente menores de 10 kiloDalton) codificados en el genoma, a diferencia de otros antimicrobianos producidos por acción enzimática, como la penicilina. Típicamente, son moléculas catiónicas que tienen una carga positiva a un pH fisiológico (aproximadamente de 7.4) debido al gran contenido de arginina y lisina (residuos cargados positivamente), pero existen los péptidos aniónicos (residuos cargados negativamente) que son ricos en ácidos aspártico y glutámico.

Generalmente, poseen carga neta entre -2 y +2 y una proporción substancial ($\geq 30\%$) de residuos hidrofóbicos, son moléculas anfipáticas lo que les concede propiedades para interaccionar con las membranas y estabilidad en ambientes tanto acuosos como hidrofóbicos.

Esta característica les permite insertarse dentro de la bicapa lipídica, y mediante la anfipaticidad pueden interactuar con las regiones polares y apolares de ella, propiedad determinada por la alineación de aminoácidos hidrofílicos en un lado de la molécula helicoidal, y de aminoácidos hidrofóbicos en el lado opuesto.

Otros péptidos presentan una separación espacial de residuos polares e hidrofóbicos lo cual, como en los casos anteriores, también les permite desestabilizar la estructura de la membrana microbiana, blanco de su acción. También pueden presentar modificaciones post-traduccionales como glicosilación, circularización, amidación de los extremos y modificación de aminoácidos incluyendo D-aminoácidos.

Los PAM se sintetizan principalmente en tejidos epiteliales regularmente expuestos al ataque microbiano como la piel, intestino y pulmones. Las células sanguíneas de defensa también son importantes productoras de PAM, donde constituyen parte de los mecanismos efectores no oxidativos contra patógenos potenciales. Los PAM se sintetizan hasta cien veces más rápido que una inmunoglobulina y a mucho menor costo metabólico, pueden almacenarse en altas concentraciones, estar disponibles para actuar inmediatamente y se liberan o producen cuando las células se estimulan por contacto con microorganismos [32-33].

1.3.2.4. Clasificación de los PAM [34]

La gran diversidad de los péptidos antimicrobianos no sólo se debe a que se han encontrado en todos los animales, sino a su variada estructura química y composición, que raramente se puede encontrar secuencias aminoacídicas iguales entre especies diferentes de animales, incluso si éstas están cercanamente emparentadas.

Sin embargo, dentro de los péptidos antimicrobianos de una sola especie, e incluso entre ciertas clases de diferentes péptidos a partir de diversas especies, la conservación de las secuencias de aminoácidos es significativamente importante y pueden ser conservadas por la molécula precursora, lo que sugiere similitudes existentes en las secuencias implicadas con la traducción, la secreción o el tráfico intracelular, y probablemente refleja la adaptación de la especie a un ambiente antimicrobial único que caracteriza su nicho, incluyendo los microorganismos asociados con las fuentes de alimento.

La variedad de péptidos antimicrobianos descubiertos es tan grande que es difícil categorizarlos, salvo en términos generales sobre la base de su estructura secundaria, por lo que se toma esta clasificación sigue la propuesta según Van't Hof et al. (2001):

Grupo I: Péptidos lineales con estructura α - helicoidal

Son estructuras anfipáticas que adoptan estructuras desordenadas en soluciones acuosas y se pliegan en conformación de hélice- α cuando interactúan con solventes hidrofóbicos o superficies lipídicas, permitiendo que sean absorbidas dentro de la superficie de la membrana o insertados a ésta como un conjunto de nudos elípticos.

La mayoría de péptidos elípticos citotóxicos son catiónicos y presentan toxicidad selectiva

a los microorganismos, pero también existen péptidos ligeramente aniónicos, los cuales exhiben menor selectividad hacia los microorganismos. En este grupo encontramos a la cecropina, magainina, dermaseptina, temporina y la melitina, entre otros, por lo que ha recibido mayor atención por su potencial de síntesis industrial y sus aplicaciones comerciales.

Uno de los péptidos negativos más estudiados es la alameticilina, que puede formar agregados que atraviesan la bicapa lipídica y rodean los poros acuosos, transportando iones. En el caso de los péptidos catiónicos la magainina es una de las más estudiadas, esta molécula puede formar poros líticos de mayor tamaño respecto a los de la alameticilina, pero no llevan a la lisis total de la membrana.

Grupo II: Péptidos predominantemente constituidos por cadenas β conectadas por puentes disulfuro intramoleculares

Son moléculas cíclicas unidas ya sea por puentes disulfuro o por la ciclación del esqueleto peptídico. Existen en gran medida en su conformación de hoja β en solución acuosa lo que les permite estabilizarse en interacciones con la superficie de los lípidos.

Las defensinas constituyen uno de los péptidos antimicrobianos más estudiados dentro de este grupo; se han sugerido diversos mecanismos de acción como la perturbación de la bicapa lipídica o la formación de canales discretos mediante métodos de cristalografía de alta resolución y resonancia magnética nuclear (2D-RMN).

Se han llevado a cabo varios estudios destinados a comprender la importancia de los puentes disulfuro, enfocados principalmente en la sustitución de residuos de cisteína por ciertos aminoácidos como Alanina, Asparagina y Leucina para su desactivación, mientras que análogos con residuos aromáticos como Fenilalanina, Tirosina y aminoácidos hidrofóbicos como Leucina, Metionina y Valina muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana.

Estudios con análogos de Tachiplesina donde los grupos sulfuro fueron químicamente protegidos para prevenir la ciclación, o el reemplazo de Cisteína por residuos de Alanina, sugiere que la estructura cíclica es esencial para la actividad antimicrobiana, mientras que no lo es para la permeabilización de la membrana.

Se tiene poco conocimiento acerca del mecanismo por el cual esta clase de péptidos antimicrobianos causan daño a la membrana, pero se ha demostrado dos estados diferentes del péptido que se insertan dentro de ésta, dependiendo de la concentración del péptido, la naturaleza del lípido y la capacidad de hidratación.

Los resultados obtenidos demostraron que un carácter altamente anfipático no es deseable en el diseño de este grupo de péptidos y que una anfipaticidad óptima puede ser definida por sustituciones sistemáticas enantioméricas.

Grupo III: Péptidos lineales con estructura extendida

Ciertos péptidos antimicrobianos tienen una conformación aminoacídica inusual, con una secuencia rica en uno o dos aminoácidos como por ejemplo la histatina, molécula rica en histidina que es producido en la saliva, este péptido se transloca a través de la membrana

de las levaduras y se enfoca en la mitocondria, lo que sugiere un mecanismo inusual antifúngico. Péptidos producidos por neutrófilos porcinos son muy ricos en Prolina - Arginina o Prolina - Fenilalanina.

El triptófano no es un aminoácido abundante en la estructuras de proteínas, sin embargo, es de particular interés en lo que respecta al posicionamiento en la superficie de la membrana por su propensión a situarse en su interfase. Péptidos ricos en triptófano como la Indocilina, adopta una conformación que incrementa en gran medida su actividad en la membrana, lo que le permite permeabilizar la membrana exterior de *Escherichia coli* a través de la formación de canales, por lo que se incorpora de una manera altamente cooperativa en la membrana.

La composición aminoacídica inusual de este tipo de moléculas ha dado lugar a estudios dirigidos a especificar la función de los múltiples residuos de triptófano en su actividad biológica, así como interacciones con distintos modelos de membrana.

Grupo IV: Péptidos con estructura en Loop (bucle)

El último grupo está compuesto por péptidos con estructura de bucle, como los lantibióticos y péptidos con un puente sulfuro único. Son capaces de apilarse para formar estructuras tubulares debido a la alta capacidad de unir las membranas lipídicas incrementando la permeabilidad de la membrana. Esta clase de péptidos tienen un gran potencial en la lucha contra enfermedades infecciosas emergentes debido a que son moléculas cortas, son fáciles de sintetizar y son proteolíticamente estables.

Los lantibióticos son péptidos cíclicos formados por puentes tioéter dada la deshidratación postraducciona de cadenas laterales de residuos de Serina o Treonina, seguido por la reacción con la cisteína, formando así otros aminoácidos inusuales como la lantionina y metil - lantionina, respectivamente. La nisina y mersacidina constituyen los péptidos lantibióticos más destacados. La nisina, se utiliza actualmente como agente antimicrobiano para la conservación de los alimentos y posee una actividad relativamente elevada frente a bacterias Gram positivas por su alta afinidad específica con el lípido II, el cual es un precursor en la síntesis de la pared celular bacteriana.

En la Figura 7 se presenta los modelos estructurales de la clasificación mencionada anteriormente. Estos modelos se basan en espectros 2D obtenidos por Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear. (A) β -defensina, Grupo II. (B) Magainina, Grupo I. (C) Bactenicina I, Grupo IV. (D) Indolicina, Grupo III.

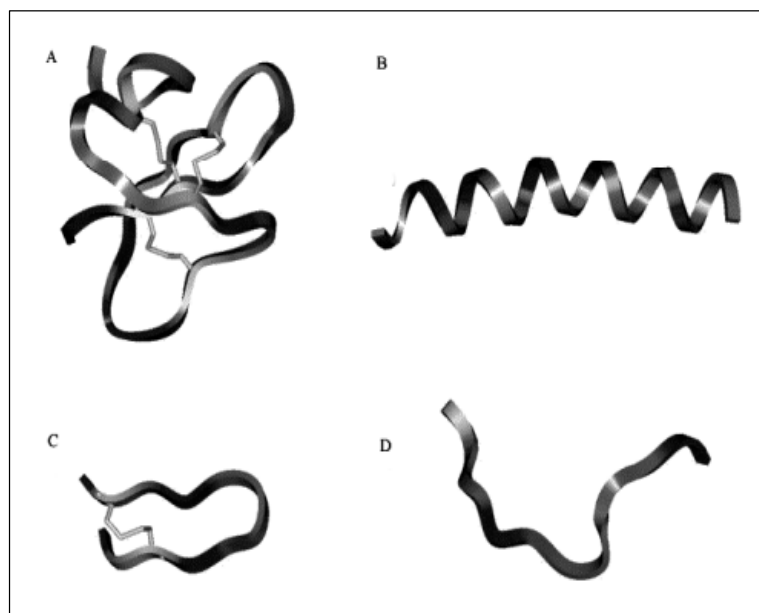


Figura 7. Modelos estructurales de la clasificación de los PAM (2D-RMN).

1.3.2.5. Mecanismo de acción [34-40]

Los péptidos antimicrobianos poseen un efecto acelerado, del orden de minutos bajo condiciones invitro, y un amplio espectro de actividad que incluye a bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, virus encapsulados, parásitos e incluso células cancerígenas. Su mecanismo de acción es muy distinto al de los antibióticos tradicionales, ya que los PAM actúan como inhibidores específicos de procesos vitales en la célula como la síntesis de la pared celular, de proteínas y ácidos nucleicos, o en la inhibición de rutas metabólicas, entre otros.

La gran variedad estructural de los PAM propone que su actividad no está dirigida a blancos celulares concretos como enzimas o receptores, sino más bien a características comunes de las membranas bacterianas.

Interacciones con la membrana

La interacción inicial de los PAM con las bacterias, generalmente, es producida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en los Gram positivos y lipopolisacáridos en los Gram negativos. Después de esta interacción, los PAM generan áreas de inestabilidad en la membrana externa, permitiendo la translocación de éstos a través de la bicapa externa; una vez localizados en la membrana, pueden sufrir una reorganización estructural pasando de un estado desnaturalizado a una estructura de carácter anfipático estabilizada por la interfase lipídica con el medio acuoso y producir daños externos o internos.

Unión a la membrana celular

Posteriormente, los PAM que se encuentran en contacto estrecho con la bacteria, deben atravesar el polisacárido capsular para poder interactuar con la membrana celular externa, permitiendo una interacción con la bicapa lipídica, uniéndose de forma paralela.

Inserción del péptido y permeabilización de la membrana celular

Se han descrito tres modelos principales posibles para explicar el mecanismo de permeabilización de la membrana medida por los PAM, así tenemos:

- **Modelo de tapón de barril (barrel-stave)**

Una vez que los PAM se han unido al exterior de la membrana, éstos se reorientan de forma perpendicular formando una verja con sus cadenas laterales hidrofóbicas que encaran el centro hidrofóbico de la membrana y sus cadenas polares enfrentan el centro creando un poro hidrofílico. El tamaño del poro incrementa si se unen nuevos péptidos, generando la muerte celular debido a la pérdida de componentes intracelulares y potencial de membrana, y a la pérdida de equilibrio osmótico.

- **Modelo de alfombra (carpet)**

En este modelo, los péptidos no se insertan en la membrana, sino que se distribuyen sobre la superficie de la membrana cubriéndola hasta alcanzar una concentración límite, lo que la debilita. Interrumpen la continuidad de la membrana insertándose en la membrana en paralelo a la bicapa lipídica mediante sus regiones hidrofóbicas, y causa su colapso en una configuración de micelio, es decir que las regiones polares de los péptidos quedan expuestas al exterior actuando de manera similar a los detergentes para desintegrar finalmente la membrana y producir la muerte celular por pérdida del citoplasma.

- **Modelo de canal agregado (aggregate channel)**

Este modelo es similar al de tapón de barril pero los poros carecen de una estructura regular. La diferencia principal con los otros modelos es la formación de poros transitorios que facilitan la penetración intracelular de los péptidos. Los canales agregados con complejos de péptidos y lípidos son parecidos a una micela pero no adoptan una orientación particular. Cuando llegan a una concentración suficiente, éstos se reorientan y se extienden en la bicapa en un complejo péptido lipídico. Estos agregados aleatorios transmembrana de lípido, péptido y agua, forman un canal permitiendo la liberación de iones y la muerte celular.

En la Figura 8 se ilustra dos de los modelos descritos anteriormente, el de barril (izquierda) y el de alfombra (derecha). Por paneles, se va mostrando la acción de los péptidos graficados como cilindros y la forma de inserción dentro de la membrana de la bacteria.

En el panel A se muestra las figuras que representa el péptido (cilindro) y la membrana de la bacteria (las esferas representan el fosfolípido, grupos de cabeza, y las dos patas conectadas a cada esfera, los dos grupos acilo de la membrana). En el modelo de barril, los péptidos se unen a la superficie de la membrana (panel B), a continuación las regiones hidrofóbicas del péptido se unen en la zona lipídica de la membrana (panel C), formando así un poro transmembranal (panel D). En el modelo de alfombra, los péptidos se unen a la superficie de la membrana con sus superficies hidrófobas formando una especie de alfombra (panel B') aumentando su permeabilidad. Cuando la concentración límite de los péptidos es alcanzado (panel C'), se crean poros transitorios que pueden conducir la desintegración de la membrana (panel E').

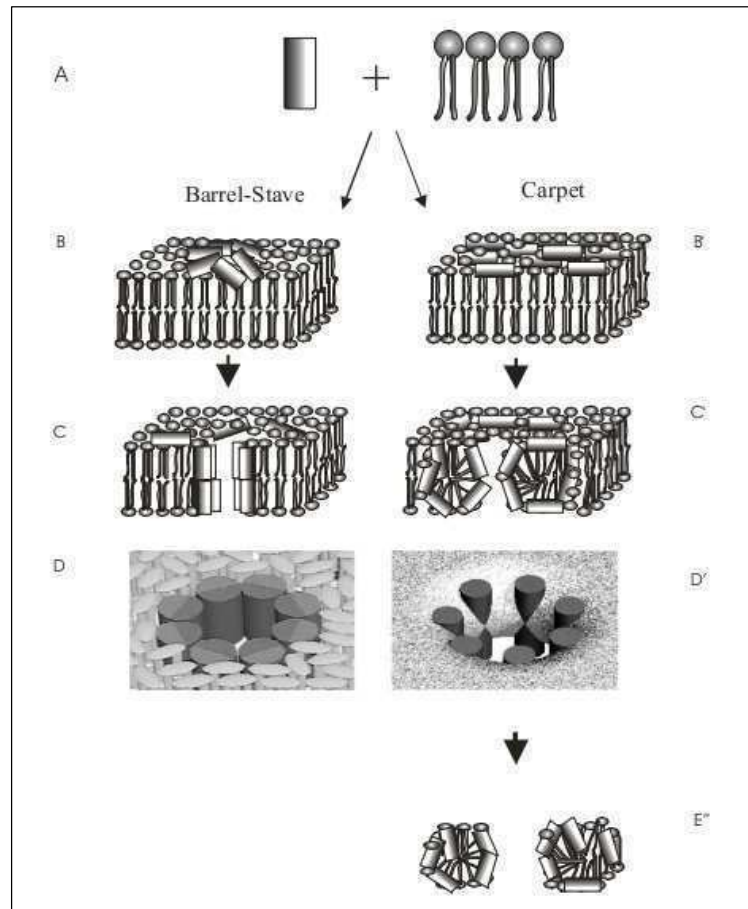


Figura 8. Ilustración del modelo de barril y carpeta para la inserción del péptido.

CÁPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se enfoca en la identificación estructural de fracciones con actividad antimicrobiana obtenidas del exudado de la rana ecuatoriana *Agalychnis spurrelli* utilizando Espectrofotometría de Infrarrojo. La Figura 9 presenta un diagrama general del proceso experimental que se aplicó en este trabajo.

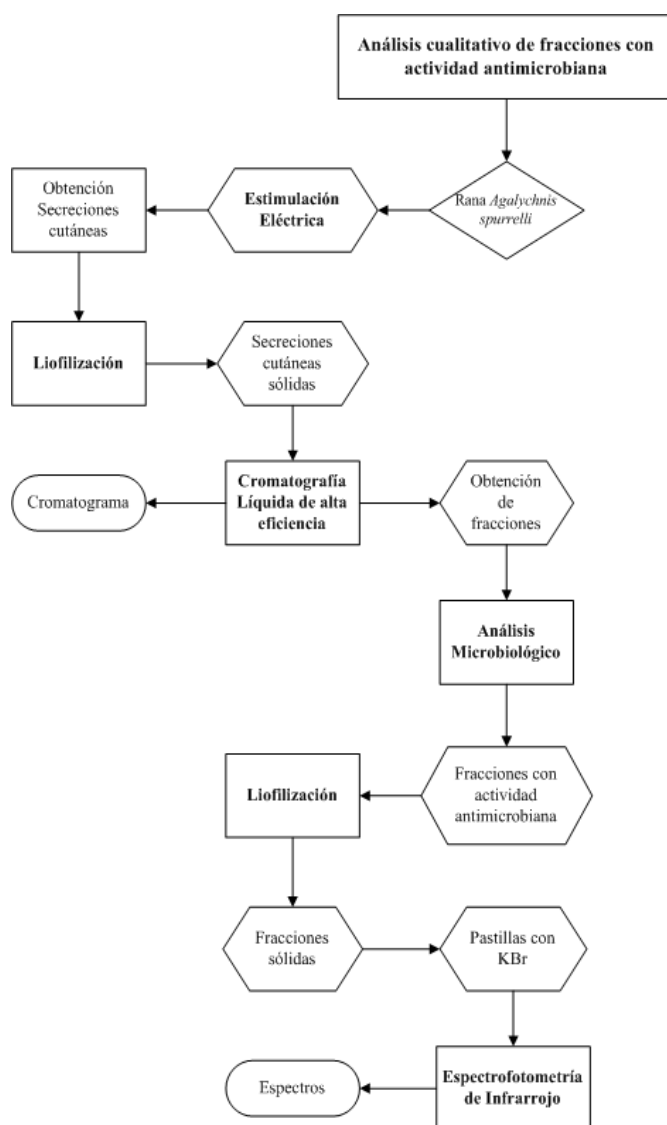


Figura 9. Diagrama general del proceso aplicado en la investigación.

2.1. Colección del extracto

Los especímenes (*Agalychnis spurrelli*) empleados para este trabajo fueron proporcionados por el Laboratorio de Citogenética de Anfibios de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, los mismos que cuentan con un número de identificación específico o serie de campo, código con el que se puede obtener toda la información acerca de cada individuo en el Museo de Zoología QCAZ sección Herpetología de la Pontificia Universidad del Ecuador. (Anexo 1).

La colección de las ranas fue autorizada por el Ministerio del Ambiente, el cual consta en los documentos No.15 y No. 008-09 IC-FAU-DNB/MA adjuntado en los Anexo 2 y 3. La colección de los especímenes se realizó en la población de Durango en la provincia de Esmeraldas entre los años 2007 y 2010. El proceso de extracción de secreciones cutáneas se realizó en un total de 30 especímenes, las cuales son mantenidas en condiciones de cautiverio estándar.

2.1.1. Equipos

- Estimulador transcutáneo para anfibios (TAS)
- Multímetro digital TRUPER

2.1.2. Materiales

- Probetas de 10mL
- Vasos de precipitación de 100mL
- Cajas Petri de 120mm de vidrio borosilicato
- Puntas de 1mL
- Pipeta volumétrica de 1mL

2.1.3. Reactivos

- Agua grado HPLC

2.1.4. Procedimiento

Para la recolección del extracto crudo de la piel del espécimen se siguen los siguientes pasos:

- Encender el TAS y medir 6 voltios con la ayuda de un multímetro.
- Tomar a la rana, humedecer su dorso con agua desionizada y colocarla sobre una caja petri estéril.
- Aplicar choques eléctricos intermitentes de aproximadamente 6 voltios, por un minuto en la zona dorsal del individuo mediante el TAS.
- Lavar la superficie dorsal de cada rana por 3 minutos con 10mL de agua desionizada.
- Tapar la caja petri y sellar con parafilm.
- Rotular la caja petri con la serie de campo de la rana y la fecha de extracción.
- Anotar el evento en el registro de extracciones y aplicación de tratamiento, en el que se detalla la serie de campo correspondiente a la rana a la que se le realizó la extracción, consecuentemente de la fecha y el número de extracciones obtenido de la rana.
- Almacenar el extracto a -20°C.

2.2. Liofilización [41]

Es un proceso de deshidratación mediante sublimación al vacío que se ha desarrollado con el fin de reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termo-sensibles de una muestra, por lo que no existen alteraciones en la estructura físico-química del material y permite su conservación indefinida sin cadena de frío, con un porcentaje bajo de humedad y alta estabilidad microbiológica.

Es el proceso más adecuado para preservar productos alimenticios, biológicos y farmacéuticos sin conservantes o productos químicos. El producto se conserva con peso muy bajo y a temperatura ambiente, manteniendo todas sus propiedades estables al rehidratarse.

La liofilización consta de tres fases: sobrecongelación, etapa en la que se lleva al producto a temperaturas muy bajas asegurando una solidificación total; la desecación primaria en donde se retira el agua del producto por sublimación; y la desecación secundaria para remover las moléculas de agua ligada en el producto (humedad residual). En comparación con otros métodos de secado, se obtiene productos de la más alta calidad. El factor principal es la rigidez estructural que se preserva en la sustancia congelada cuando se verifica la sublimación, evitando el colapso de la estructura porosa después del secado. Las temperaturas bajas que se emplean reducen al mínimo las reacciones de degradación que casi siempre ocurren en los procesos comunes de secado.

En la Figura 10 se presenta el esquema general de un liofilizador, posee tres componentes principales: la cámara de secado, el condensador y la bomba de vacío. Generalmente, los equipos pequeños de laboratorio poseen las mismas partes representadas en el esquema,

pero se encuentran integradas en un solo equipo. En este diagrama se puede ver la cámara de secado, se encuentran los platos en donde se colocan el producto por liofilizar, el sistema calórico que se utiliza para la desecación, y el grupo de refrigeración que congela el producto para que se dé la sublimación. A continuación, se localiza el condensador en el cual se va a solidificar toda el agua retirada del producto. Finalmente, se halla la bomba de vacío que producirá presiones bajas para que se produzca la sublimación del agua contenida en el producto.

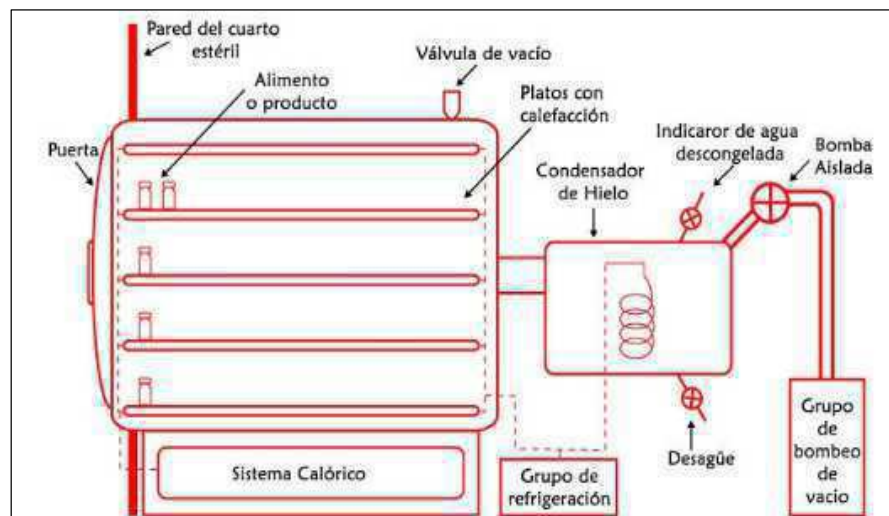


Figura 10. Esquema de un equipo de Liofilización.

2.2.1. Equipos

- Balanza analítica Sartorius con precisión 0.1mg
- Liofilizador Virtis Advatage Plus

2.2.2. Materiales

- Cajas Petri de 120mm de vidrio borosilicato
- Puntas para pipeta de 1mL

- Pipeta volumétrica autoclavable de 100 - 1000 μ L
- Tubos Falcon® de 15mL
- Espátula

2.2.3. Reactivos

- Agua desionizada

2.2.4. Procedimiento

Para la liofilización del extracto se deben seguir los siguientes pasos:

- Colocar las cajas petri con los extractos en las bandejas sin su tapa, para ello éstas fueron previamente rotuladas en la base y selladas con cinta adhesiva para evitar la pérdida de su identificación.
- Introducir las bandejas con las cajas petri al equipo de liofilización.
- Encender el equipo y el ordenador acoplado a éste.
- Realizar la receta que controla automáticamente el proceso en el computador y cargarla en el equipo. Iniciar la liofilización.
- Una vez culminado el proceso de liofilización, detener manualmente el equipo, esperar a que el sistema llegue a presión atmosférica, y sacar las muestras secas del equipo.
- Pesar el sólido obtenido y recolectar en tubos Falcon. Identificar cada tubo, con el peso total del extracto sólido obtenido. Almacenar a -20°C.
- Registrar el peso del tubo con los extractos sólidos unidos y su identificación.
- Dejar descongelar el agua retenida en el condensador y secar completamente la cámara de secado.
- Para evitar pérdidas de muestra, añadir agua desionizada en todas las cajas petri

después de haber colectado el sólido en el tubo, y liofilizar nuevamente siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

La figura 11 muestra el método optimizado para la liofilización de soluciones acuosas de secreciones cutáneas. Se describe todo el proceso de liofilización por pasos iniciando por el tratamiento termal en el que se designa valores de temperatura en °C (Temp.), el tiempo que dura cada paso en minutos (Time), y si el paso se da en H (Hold) manteniendo la temperatura o en R (Ramp) para una disminución gradual de la temperatura con respecto al tiempo.

Después se encuentra los parámetros para la etapa de sobrecongelamiento, estableciendo la temperatura de inicio (Freeze), el tiempo de la etapa (Extra Freeze), la temperatura del condensador al que el sistema de vacío puede habilitarse (Condenser), y al nivel de vacío (miliTorr) que el sistema debe alcanzar después de alcanzar la temperatura del condensador (Vacuum). Una vez que la presión es alcanzada, se prosigue con la fase de secado primario, en el cual se puede ingresar hasta 16 pasos, se define de igual manera la temperatura, el tiempo, la presión (miliTorr) y si es el paso se da en H o R. En la casilla de Secondary SP se fija la Temperatura de inicio de la fase de secado secundario, y Post Ht señala las condiciones de secado secundario determinando la temperatura, tiempo y presión.

Current Recipe: C:\Virtis\peptidos6.rcw

Recipe Number: 6

Extraccion

F2 Synoptic

F3 PC Save

F4 Print

F7 Write

F8 Read

Thermal Treatment

	Temp	Time	R/H
Step 1	10	20	H
Step 2	-40	240	R
Step 3	-40	30	H
Step 4	0	0	
Step 5	0	0	
Step 6	0	0	
Step 7	0	0	
Step 8	0	0	
Step 9	0	0	
Step 10	0	0	
Step 11	0	0	
Step 12	0	0	

Freeze: -40

Extra Freeze: 15

Condenser: -50

Vacuum: 500

Secondary SP: 20

Primary Drying

	Temp	Time	Vacuum	R/H
Step 1	-40	30	100	H
Step 2	-10	300	100	R
Step 3	-10	20	100	H
Step 4	20	300	100	R
Step 5	20	10	100	H
Step 6	0	0	0	
Step 7	0	0	0	
Step 8	0	0	0	
Step 9	0	0	0	
Step 10	0	0	0	
Step 11	0	0	0	
Step 12	0	0	0	
Step 13	0	0	0	
Step 14	0	0	0	
Step 15	0	0	0	
Step 16	0	0	0	

Post Ht: 20 30 500

Figura 11. Método para la liofilización de secreciones cutáneas.

2.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, siglas por su nombre en inglés) [42, 43].

Es una técnica utilizada para separar una mezcla de compuestos, el cual se basa en la distribución de los componentes en dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil corresponde a un líquido que lleva a la muestra a través de la fase estacionaria contenida en una columna. Este método se utiliza para la identificación cualitativa y cuantitativa de los componentes de una muestra.

En cromatografía líquida de alta eficiencia, la muestra pasa a través de una columna de fase fija bombeando la fase móvil líquida con presión alta. La muestra se introduce a la corriente de la fase móvil, en la que sus componentes se separan según su afinidad con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. La instrumentación consiste básicamente

en un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, sistema de bombas, inyector, columna, y detector.

En la Figura 12 se puede observar un esquema del equipo que se utilizó para la separación en este trabajo, el cual dispone del reservorio de fase móvil para dos solventes, un sistema de bombas binario, el mezclador en donde se combinan los solventes, el inyector automático en el que ingresa la muestra al sistema cromatográfico, la columna que separa los componentes de la muestra, el detector que obtiene la absorbancia de cada componente y produce un cromatograma con respecto al tiempo, finalmente se encuentra el colector de fracciones en el que se recogen volúmenes a diferentes tiempos de retención.

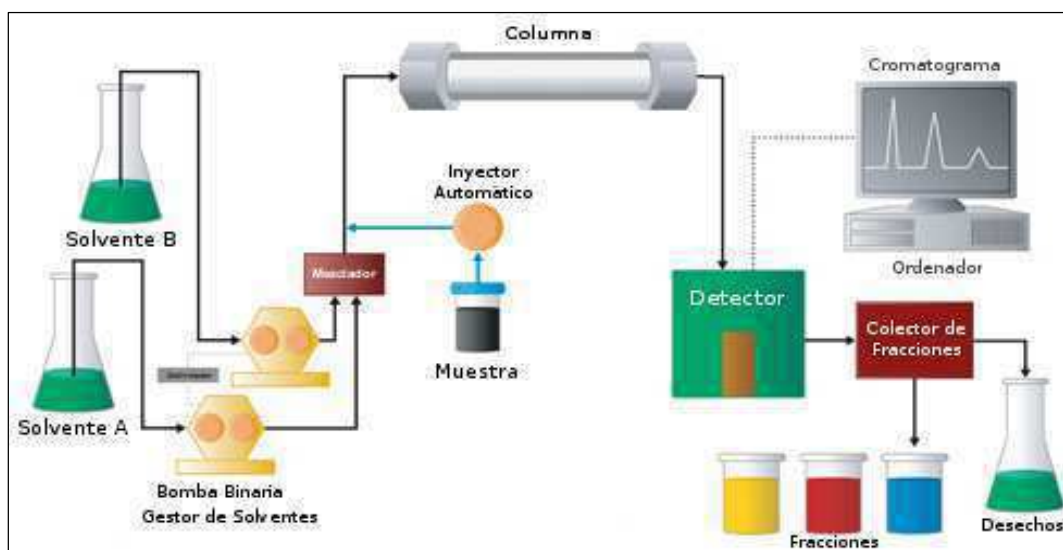


Figura 12. Esquema de un cromatógrafo líquido de alta eficiencia.

Cromatografía de fase inversa

Este tipo de cromatografía es relativamente popular ya que se obtiene picos agudos, simétricos y el equilibrio en las reacciones de adsorción/desorción tiende a ser rápido. El término de fase inversa describe el uso de una fase móvil polar y una fase estacionaria no polar.

La Figura 13 ilustra la separación de una muestra por cromatografía de fase inversa, en la cual el compuesto más fuertemente retenido es el colorante azul ya que su atracción hacia la fase estacionaria no polar es mayor. En contraste con el colorante amarillo, que es débilmente retenido y llevado por la fase móvil polar a través del lecho estacionario, eluyendo primero.



Figura 13. Columna de fase inversa.

Actualmente, la cromatografía de fase inversa se utiliza aproximadamente en el 75% de todos los métodos aplicados en HPLC (High performance liquid chromatography), debido a que es más reproducible y tiene una amplia aplicabilidad. La mayoría de estos protocolos, utiliza como fase móvil una mezcla acuosa con un disolvente miscible orgánico (polar), tal como acetonitrilo o metanol; esta mezcla de solventes asegura la interacción apropiada de los analitos con la superficie de las partículas no polares. La sílice unida al grupo octadecilo (C_{18}), es el tipo de empaque más popular de fase inversa en HPLC.

2.3.1. Equipos

- Cromatógrafo líquido de alta presión
 - Bomba Binaria Waters 1525
 - Inyector Automático Waters 2707
 - Calentador de Columnas Waters 1500

- Columna semipreparativa marca Waters Xbridge™ BEH300 C₁₈, 10x250mm, tamaño de partícula de 5µm.
 - Detector UV/Vis Waters 2489
 - Colector de Fracciones III Waters
 - Software Empower 2
-
- Balanza analítica Sartorius con precisión 0.1mg
 - Sistema de Filtración al vacío Millipore No.WP6111560

2.3.2. Materiales

- Filtro de membrana Durapore, PVDF, 0,45µm de poro, 47mm de diámetro
- Jeringa desechable de plástico estéril de 5mL con aguja
- Discos de filtración con membrana de PVDF, 0.22µm de poro, 13mm de diámetro
- Viales con tapa y septum de 2mL
- Frascos de vidrio de 250, 500, 1000mL
- Tubos colectores de vidrio de 10mL con tapa de teflón
- Gradilla
- Puntas de 1mL
- Pipeta volumétrica autoclavable de 1000µL
- Tubos Falcon® de 15mL

2.3.3. Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido trifluoroacético (TFA) al 99%

- Agua desionizada grado HPLC
- Metanol grado HPLC

2.3.4. Preparación de reactivos

Las soluciones se las debe preparar con la protección correspondiente: guantes de nitrilo, gafas y mascarilla, y bajo una campana de extracción, ya que el ácido trifluoroacético es un compuesto volátil y muy tóxico.

- Solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.12% (V/V)

- Llenar la cuarta parte de un balón aforado de 250mL con agua desionizada grado HPLC.
- Tomar 0.30mL de TFA con una pipeta volumétrica de 1000μL y colocar en el balón.
- Aforar a 250mL con agua desionizada grado HPLC.
- Desgasificar la solución filtrando al vacío.

- Solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.10% (V/V)

- Llenar la cuarta parte de un balón aforado de 250mL con agua desionizada grado HPLC.
- Tomar 0.25mL de TFA con una pipeta volumétrica de 1000μL y colocar en el balón.
- Aforar a 250mL con agua desionizada grado HPLC.
- Desgasificar la solución filtrando al vacío.

2.3.5. Preparación de muestras

- Pesar 20mg de la muestra sólida obtenida del proceso de liofilización.
- Disolver en 2mL de ácido trifluoroacético (TFA) 0.12% en agua grado HPLC.
- Agitar la muestra manualmente hasta disolver el sólido, se lo debe hacer con cuidado ya que los compuestos por separar son termolábiles y cualquier aumento de temperatura puede desnaturalizar a la muestra.
- Colocar la solución obtenida en una jeringa desechable, y filtrar con los discos de filtración en viales para HPLC.
- Colocar el vial en el plato del inyector automático.

2.3.6. Análisis Cromatográfico

- Filtrar al vacío el agua desionizada grado HPLC, y colocar en un frasco de vidrio limpio y estéril de 1000mL.
- Colocar acetonitrilo grado HPLC en un frasco de vidrio limpio y estéril de 1000mL.
- Introducir los buzos unidos al sistema cromatográfico a los frascos con los solventes, revisar que éstos estén sumergidos totalmente en los frascos que llevan el agua desionizada y el acetonitrilo.
- Realizar la purga externa de las bombas y la purga interna del sistema cromatográfico con agua desionizada y acetonitrilo con un flujo no mayor a 2mL/min.
- Realizar la limpieza de la aguja del inyector automático con metanol grado HPLC.
- Acondicionar la columna con la solución acuosa de TFA al 0.12%, con flujo de 2mL/min.
- Enumerar 70 tubos de vidrio y ponerlos en el colector.

- Inyectar la muestra de manera automática en un volumen de 1000 μ L.
- Para el fraccionamiento, utilizar una solución acuosa de TFA al 0.10% con acetonitrilo, mediante gradiente de elución detallado en la Figura 14. En este cuadro se puede observar el flujo programado para para la separación en el que se establece el tipo de separación (Pump Mode), luego se detalla el número de pasos en el que se realiza el gradiente de elución, el tiempo en el que va a iniciar el paso (minuto de corrida), el flujo que transcurre durante el paso, el %A corresponde al porcentaje de solvente que se encuentra en la Bomba A (solvente orgánico, acetonitrilo), y el %B correspondiente a la Bomba B (solventes inorgánicos o acuosos).

Programmed Flow

Pump Mode: Gradient

	Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1		2,00	0,0	100,0	0,0	
2	2,00	2,00	0,0	100,0	0,0	6
3	12,00	2,00	10,0	90,0	0,0	6
4	22,00	2,00	20,0	80,0	0,0	6
5	32,00	2,00	30,0	70,0	0,0	6
6	42,00	2,00	40,0	60,0	0,0	6
7	52,00	2,00	50,0	50,0	0,0	6
8	62,00	2,00	60,0	40,0	0,0	6
9	72,00	2,00	70,0	30,0	0,0	6
10	73,00	1,00	70,0	30,0	0,0	6
11	74,00	0,00	70,0	30,0	0,0	6

Figura 14. Gradiente de elución utilizada en la separación.

- Monitorear la corrida a 214nm con un detector UV/Vis durante 74 minutos.
- Realizar la limpieza interna del sistema cromatográfico con agua desionizada con un flujo no mayor a 2mL/min.
- Cerrar cada tubo colector con su tapa respectiva, y ponerlas en una gradilla.
- En el caso de no liofilizar inmediatamente las fracciones, almacenarlas en Tubos Falcon® a -20°C e identificar cada tubo con el número de fracción correspondiente.

2.4. Ensayos Microbiológicos

Dentro del proyecto se realizaron pruebas microbiológicas en cada fracción obtenida para la determinación de la actividad antimicrobiana. Se utilizaron cepas y aislados de bacterias de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, las mismas que ya dieron una respuesta positiva con el exudado de la rana [3]. Estas cepas y aislados fueron suministrados por el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. El análisis microbiológico se realiza por triplicado y en cinco distintas proporciones por cada cepa y aislado de los tres tipos de bacterias [5]. Luego de establecer las fracciones con actividad, se procede a su liofilización y análisis cualitativo.

2.5. Liofilización de Fracciones

2.5.1. Equipos

- Balanza analítica Mettler Toledo modelo AB204 con precisión 0.1mg
- Liofilizador Virtis Advatage Plus

2.5.2. Materiales

- Cajas Petri de 120mm y 60mm de vidrio borosilicato

- Puntas para pipeta de 1mL
- Pipeta volumétrica autoclavable de 100 - 1000 μ L
- Balones aforados de 10mL
- Microtubos Eppendorf autoclavables de 1.5mL

2.5.3. Reactivos

- Agua desionizada

2.5.4. Procedimiento

- Tomar los 2mL colectados de cada fracción, y diluir a un factor de 5x con agua desionizada.
- Colocar las fracciones diluidas en cajas petri previamente identificadas en su base y selladas con cinta adhesiva.
- Poner las cajas petri en las bandejas e incorporarlas al equipo de liofilización, en donde el proceso de congelación lleva un mínimo de 5 horas, y el secado por sublimación y desorción dura aproximadamente 15 horas. El proceso se repite con varias alícuotas de cada fracción hasta que el sólido se pueda pesar en las balanzas disponibles.
- El sólido obtenido de cada fracción es pesado y recolectado en microtubos Eppendorf, los mismos que son identificados con el número de fracción correspondiente.
- Registrar el peso del extracto sólido obtenido, consecuentemente de la fecha de liofilización y el volumen de solución liofilizada.
- Almacenar las fracciones liofilizadas a -20°C.

2.6. Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FT-IR) [43-46]

En el espectro electromagnético, la región del infrarrojo cubre una zona muy amplia que se encuentra a continuación de la zona visible hacia longitudes de onda de la región del microondas. Desde el punto de vista aplicativo de instrumentación, esta región se divide en infrarrojo cercano (1-2.5 μ m), medio (2.5-50 μ m) y lejano (50-1000 μ m), pero la zona más utilizada es el infrarrojo medio [41].

En la Figura 15 se muestra la óptica de un equipo de espectrometría de Infrarrojo de un solo haz, la radiación que procede de la fuente pasa por el compartimiento en donde se coloca el porta-muestra, después se produce la dispersión del haz con un sistema óptico y llega al detector IR en donde se acumulan los datos y se almacenan los resultados en el ordenador acoplado al instrumento. Consecuentemente se coloca la muestra en la trayectoria de la radiación y se repite el proceso. Se calcula la relación entre los datos espectrales de la muestra y la referencia, obteniendo la transmitancia a distintas frecuencias.

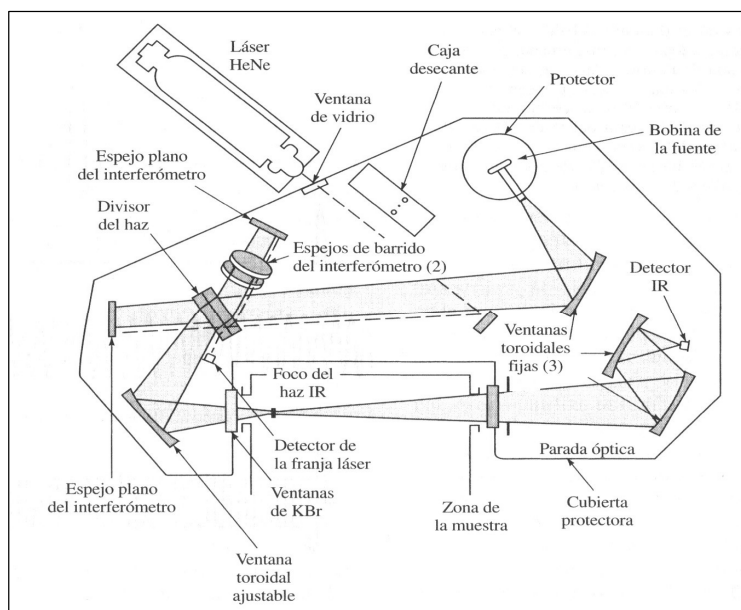


Figura 15. Esquema de un espectrómetro FT-IR de un solo haz.

Es una técnica rápida, amigable al usuario, no destructiva y bastante fiable que posee una gran versatilidad para la caracterización y monitoreo de muchos procesos. La absorción de radiación en esta región produce cambios de energía en el orden de 8 a 40kJ/mol que coincide con frecuencias vibracionales de la mayoría de enlaces de las moléculas, así como de la identidad de los átomos en la molécula, y de la molécula en sí.

El espectro de infrarrojos es el resultado de los diferentes tipos de vibraciones de estiramiento y deformación que puede experimentar una molécula por la absorción de energía en esta región, en éste se registra la cantidad de radiación absorbida como transmitancia o absorbancia versus la longitud de onda o número de onda.

Interpretación de espectros para el análisis cualitativo [43, 46]

La espectroscopia infrarroja, en combinación con la espectroscopia de masas y la resonancia magnética nuclear, forma la base del análisis cualitativo contemporáneo: la identificación de la estructura molecular de compuestos y mezclas desconocidas.

El espectro de infrarrojos es característico del compuesto y proporciona información útil para su identificación. Además del espectro, se obtiene información de los grupos funcionales presentes en la molécula, es decir se obtiene información estructural.

Para proceder a identificar un compuesto, se determina primero los grupos funcionales del mismo, observando la zona del espectro conocida como región de frecuencias de grupo, zona comprendida entre 3600 y 1200 cm^{-1} . Para ello, se utilizan tablas de frecuencias de grupo, en las que se tienen intervalos de frecuencia dentro del cual es posible encontrar una banda de absorción para un grupo funcional determinado. Posteriormente, se compara la

región de la huella dactilar del espectro comprendida entre 1200 y 600cm^{-1} con el espectro de otros compuestos que presenten los mismos grupos funcionales, si existen bandas coincidentes en esta zona, se determina claramente la identificación del compuesto.

2.6.1. Equipos

- Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformadas de Fourier Perkin Elmer BTXII
- Balanza analítica Mettler Toledo modelo AB204 con precisión 0.1mg

2.6.2. Materiales

- Prensador hidráulico
- Empastillador Perkin Elmer
- Mortero de Agatha
- Espátulas
- Pinzas
- Cajas Petri de 60mm
- Desecador

2.6.3. Reactivos

- Acetona grado reactivo
- Bromuro de Potasio grado espectrométrico

2.6.4. Procedimiento

El pastilleo se debe realizar en una zona libre de humedad, con materiales limpios y secos, por lo que se utiliza acetona para la limpieza tanto de la zona como de los materiales, y una

lámpara infrarroja para mantener una zona seca durante todo el proceso.

- Preparar una pastilla al 1-2% de la fracción sólida en Bromuro de Potasio, tomar previamente un peso aproximado de 1mg de la fracción liofilizada y triturar en el mortero de Agatha.
- Pesar 100mg de Bromuro de Potasio, pasar al mortero, y mezclar con la fracción con la ayuda de una espátula de manera que la fracción y el bromuro formen una mezcla homogénea.
- Posteriormente, colocar la mezcla en el empastillador, distribuir uniformemente en toda el área del pistón y cerrar el sistema.
- Llevar al vacío por dos minutos con el fin de eliminar partículas de humedad o cualquier tipo de solvente.
- Colocar el empastillador en el prensador hidráulico y llevar hasta 14000p.s.i. de presión. Desbloquear el pistón con la ayuda del mismo prensador y retirar la pastilla con la pinza.
- Guardar la pastilla en una caja petri etiquetada y almacenar en el desecador.
- Limpiar todo el material con acetona para preparar la siguiente pastilla.
- Finalmente, se coloca la pastilla en el portamuestra y se procede a la obtención del espectro, utilizando los parámetros descritos en la Figura 16, el cual detalla el nombre designado al espectro por obtener, alguna descripción adicional de la muestra como la fecha de lectura o alguna característica física, el rango en el que va a dar la lectura de la muestra, el número de barridos de lectura, la resolución, el intervalo, y finalmente se establece si el espectro se genera en Transmitancia o Absorbancia.

Scan Sample [X]

Spectrum Details

Filename: ☒ Ratio ☐ Single Beam ☐ Interferogram

Description:

Scan Parameters

Range: Start End cm-1

Number of Scans: ☐ Scan Minimized

Resolution: cm-1 Interval cm-1

Units:

OK Cancel Comments Setup Help

Figura 16. Parámetros utilizados para la corrida de los espectros en IR.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Extracción Cutánea de *Agalychnis spurrelli*

Se realizó un total de 133 extracciones para este segmento del proyecto, la solución obtenida era un líquido transparente espeso con olor característico a leguminosa, aproximadamente de 10mL. No se obtuvo un volumen exacto debido a que el sostener la rana, el movimiento y la presión que genera durante la extracción producen pérdidas de la solución.

El método de extracción empleado para los exudados de las ranas es una técnica no invasiva que causa un estímulo inofensivo al animal, por lo que resulta un procedimiento ideal para este tipo de investigación ya que las muestras recogidas son relativamente libres de impurezas y no se requiere mayor preparación para análisis posteriores.

En la Tabla 1 se presenta todas las extracciones ejecutadas descritas con la fecha, serie de campo de la rana, el número correspondiente a la extracción realizada, datos obtenidos del registro interno del laboratorio.

Cabe mencionar que realizar el procedimiento de estimulación con este equipo requiere de mucho cuidado, paciencia y responsabilidad del analista, ya que se cuenta con un número limitado de la especie en el laboratorio y son necesarias para que el proyecto todavía sea sustentable y proseguir con la investigación.

Tabla 1. Copia del registro de extracciones en los especímenes *Agalychnis spurrelli* que se realizaron para el presente estudio.

Número	Serie de Campo	Extracción No.	Fecha	Extracción No.	Fecha	Extracción No.	Fecha	Extracción No.	Fecha	Extracción No.	Fecha	Extracción No.	Fecha	Extracción No.	Fecha
1	SC 27297	33	02/09/10	34	07/10/10	35	04/01/11	36	11/04/11	37	23/05/11	38	08/12/11		
2	SC 27298	33	02/09/10	34	07/10/10	35	04/01/11	36	11/04/11	37	29/09/11	38	08/12/11		
3	SC 27299	29	02/09/10	30	07/10/10	31	15/02/11	32	11/04/11	33	29/09/11				
4	SC 27300	4	02/09/10	5	13/10/10	6	11/04/11	7	29/09/11	8	08/12/11				
5	SC 15748	18	03/09/10	19	26/10/10	20	11/04/11	21	29/09/11	22	09/12/11				
6	SC 15876	12	08/06/10	13	31/08/10	14	26/10/10	15	15/02/11	16	11/04/11	17	05/10/11	18	09/12/11
7	SC 15878	11	08/06/10	12	03/09/10	13	09/11/10	14	15/02/11	15	11/04/11	16	05/10/11	17	09/12/11
8	SC 15879	12	13/04/10	13	08/06/10	14	31/08/10	15	09/11/10	16	15/02/11	17	11/04/11	18	05/10/11
9	SC 15880	10	13/04/10	11	08/06/10	12	03/09/10	13	09/11/10	14	11/04/11	15	05/10/11		
10	SC 26515	1	30/07/10	2	06/10/10	3	04/01/11	4	19/05/11	5	05/10/11				
11	SC 26516	1	30/07/10	2	07/10/10	3	04/01/11	4	17/10/11						
12	SC 26517	1	27/07/10	2	07/10/10	3	04/01/11	4	23/05/11						
13	SC 15886	11	28/04/10	12	08/06/10	13	31/08/10	14	17/11/10	15	18/04/11				
14	SC 15887	11	31/05/10	12	24/08/10	13	06/09/10	14	17/11/10	15	04/01/11	16	18/04/11		
15	SC 15889	12	31/05/10	13	24/08/10	14	06/09/10	15	17/11/10	16	18/04/11				
16	SC 15891	11	02/06/10	12	06/09/10	13	17/11/10	14	18/04/11						
17	SC 15892	9	02/06/10	10	09/09/10										
18	SC 15894	10	02/06/10	11	09/09/10										
19	SC 15896	11	04/06/10	12	15/09/10	13	17/11/10	14	18/04/11						
20	SC 15900	11	04/06/10	12	15/09/10										
21	SC 15902	10	04/06/10	11	15/09/10	12	17/11/10	13	18/04/11						
22	SC 26518	1	27/07/10	2	07/10/10	3	04/01/11	4	23/05/11						
23	SC 26519	1	27/07/10	2	07/10/11	3	04/01/11	4	23/05/11						
24	SC 15932	6	15/09/10	7	17/11/10										
25	SC 26349	4	04/06/10	5	15/09/10	6	26/11/10	7	18/04/11						
26	SC 26350	4	21/09/10	5	26/11/10	6	24/02/11	7	18/04/11	8	23/05/11				
27	SC 26352	3	21/09/10	4	26/11/10	5	24/02/11	6	19/05/11						
28	SC 26353	3	21/09/10	4	19/05/11										
29	SC 26354	3	06/10/10	4	26/11/10	5	24/02/11	6	19/05/11						
30	SC 26355	3	06/10/10	4	04/01/11	5	19/05/11								

3.2. Liofilización de los extractos

El proceso de deshidratación de los extractos se realiza en un equipo de liofilización fácil de utilizar, en el cual se puede llevar a cabo procesos controlados mediante termocuplas incorporadas y de esta manera llevar una supervisión más detallada del proceso de liofilización.

El método incorporado se lo planteó a partir de recomendaciones exclusivas de los técnicos que instalaron el equipo, refiriéndonos como factor principal la naturaleza de las muestras que estamos utilizando. En la etapa de congelamiento se estableció que se debe proceder en un mínimo de cinco horas para asegurar que la muestra esté sólida por completo, así se evita que se den congelamientos rápidos, los cuales producirán cristales pequeños y aglomerados lo que impide que la sublimación y desorción del agua se complete.

Con respecto al tiempo establecido para el tratamiento termal, se realizaron distintas pruebas en las que se experimentaron rangos de tiempos en la desecación primaria, se tomaron periodos de 300 minutos para el aumento progresivo de la temperatura, manteniendo una presión de 100 miliTorr, así como la inclusión de rangos de tiempo en que la temperatura era constante, especialmente en el primer y último paso en los que se mantenían (Hold) para garantizar que el proceso de sublimación concluya sin problemas. Para el secado secundario, la temperatura se mantiene con respecto al último paso del secado primario y se asegura el secado total de la muestra eliminando la humedad residual.

En la Figura 17 se ilustra el registro de datos gráficos que ejecuta el equipo durante el proceso. Para ello, se tiene en el eje y la temperatura representada en grados centígrados (°C) y la presión en millitorr (mT) con respecto al tiempo en minutos (min) en el eje x; se

utilizaron tres termocuplas colocadas en la superficie de tres muestras escogidas al azar, cada muestra localizada en los distintos platos del equipo, y una última termocupla registrando la temperatura directa de uno de los platos, representadas por las curvas en color verde claro (1), azul (2), fucsia (3), y celeste (4); estas curvas se comparan con una termocupla incorporada en el equipo, representada por la línea de color rojo (Shlf). La gráfica muestra valores similares, lo que asegura que todo el sistema mantiene una temperatura igual sin diferencias notables entre los platos del equipo.

Además, en la gráfica está representado el funcionamiento de condensador con la curva de color verde oscuro (Cond), y el de la bomba de vacío con la curva de color azul (Vac). Las curvas denotan un funcionamiento normal para el condensador durante el proceso, así como el vacío se logra dar con el decaimiento de la presión hasta llegar al valor esperado, donde éste se mantiene durante toda la etapa de sublimación.

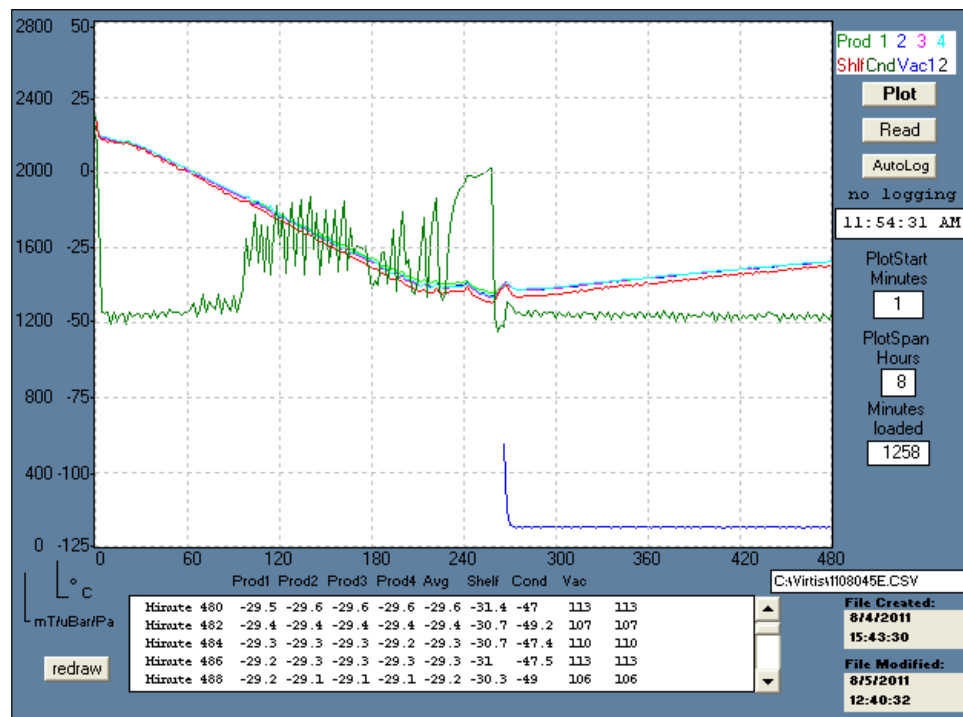


Figura 17. Gráfico del proceso de liofilización de secreciones cutáneas.

Los extractos liofilizados con éxito mostraron un sólido de partículas muy finas y livianas, de color blanco, las mismas que se recolectaron en tubos eppendorf para su almacenamiento. Se obtuvo un total de 10 tubos, de acuerdo con las liofilizaciones realizadas. Para los análisis posteriores se unieron las secreciones obtenidas, ya que durante el proceso de optimización del análisis cromatográfico se realizaron corridas tanto del sólido obtenido del extracto de una sola rana así como de los sólidos mezclados de varias ranas, y no mostraron mayores diferencias entre cromatogramas, lo que demuestra que el exudado de cualquier rana *Agalychnis spurrelli* posee los mismos compuestos.

En la Tabla 2 se presentan los pesos obtenidos de la liofilización identificando cada tubo por orden alfabético, y determinando la cantidad disponible de muestra para este trabajo.

Tabla 2. Pesos obtenidos de las liofilizaciones de las secreciones cutáneas.

Tubo	Peso (g)
A	0.2416
B	0.1171
C	0.1821
D	0.1139
E	0.0133
F	0.1141
G	0.2134
H	0.0503
I	0.0461
J	0.0819
Total	1.1738

3.3. Análisis Cromatográfico

3.3.1. Optimización del método

El método de separación del extracto crudo fue desarrollado basado en la información de publicaciones científicas [47], realizando las pruebas correspondientes para su

optimización en las condiciones necesarias para la obtención de fracciones de acuerdo a su tiempo de retención. El laboratorio ha estado utilizando este método de separación en el proyecto mucho antes de empezar esta investigación, por lo que no se pudo realizar otras pruebas que demuestren que es un proceso inmejorable. Además, no se puede realizar la validación del método ya que no existe una solución estándar o una solución matriz de características similares a la muestra que pueda demostrar la reproducibilidad de la separación.

A continuación, se expone en la Tabla 3 las características del equipo así como los parámetros que se optimizaron para la obtención de las fracciones, determinado por el número de espectros similares producidos.

Tabla 3. Condiciones de operación optimizadas para la separación del extracto crudo de ranas.

Condiciones Experimentales			
Cromatógrafo	Sistema Waters HPLC	Velocidad de flujo	2mL/min
Columna	Semipreparativa C18 Xbridge™ BEH300	Acondicionamiento de la Columna	0.12% (v/v) TFA/H ₂ O
Detector	UV-VIS	Longitud de onda	214 nm
Inyección de muestra	Automática	Volumen de inyección	1000 µL
Temperatura de la columna	20 °C	Tiempo de corrida	74min
Preparación de la Muestra	20mg disuelto en 2mL de 0.12% (v/v) TFA/H ₂ O	Fase móvil	0.10% (v/v) TFA/H ₂ O, acetonitrilo

3.3.2. Obtención de Fracciones

Con las condiciones optimizadas para la corrida, se obtuvieron fracciones con un colector pospuesto al detector, recolectando a los dos minutos después de iniciar la corrida, recogiendo un volumen aproximado de 2mL por minuto. Las fracciones obtenidas eran líquidas, incoloras y tenían el olor característico del acetonitrilo pero muy tenue. Para la determinación de la existencia de compuestos por separar en la secreción cutánea de la rana, se realizaron blancos con los que se comprobó que se tiene una línea base aceptable y los picos que presentan los solventes que conforman la fase móvil así como el solvente de la muestra.

En la Figura 18 se muestra el cromatograma correspondiente al blanco, el cual evidencia que el sistema se encuentra estable; el blanco toma las mismas condiciones, el mismo método a excepción de que sólo se inyecta el solvente para la muestra que es 0.12% (V/V) de TFA/H₂O.

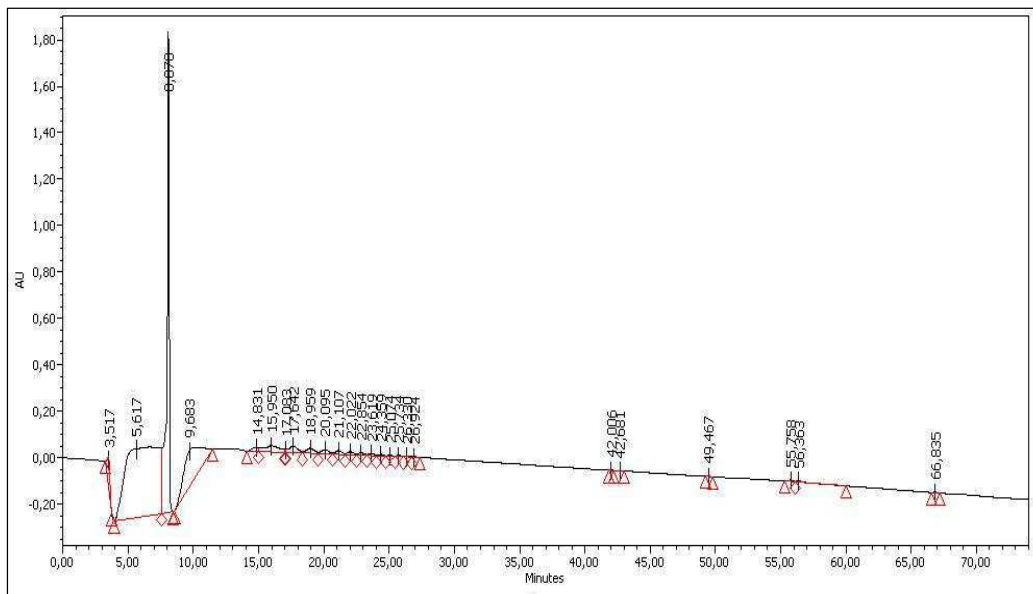


Figura 18. Cromatograma del Blanco, solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,12% (V/V).

Se realizaron 57 fraccionamientos en total con las muestras liofilizadas, de las cuales se obtuvo un volumen de 2mL de cada fracción en cada corrida. Las fracciones obtenidas se utilizaron tanto para el análisis microbiológico como para el análisis cualitativo.

A continuación se muestra en la Figura 19, el cromatograma correspondiente al exudado de la rana con serie de campo SC25349 y en la Figura 20, el cromatograma correspondiente a una muestra de secreciones cutáneas mezcladas de varias ranas, demostrando que no existe mayor diferencia entre ellos, por lo que para realizar las siguientes corridas se unieron las muestras liofilizadas. En el Anexo 4 se presentan los cromatogramas de las demás corridas realizadas para la obtención de las fracciones.

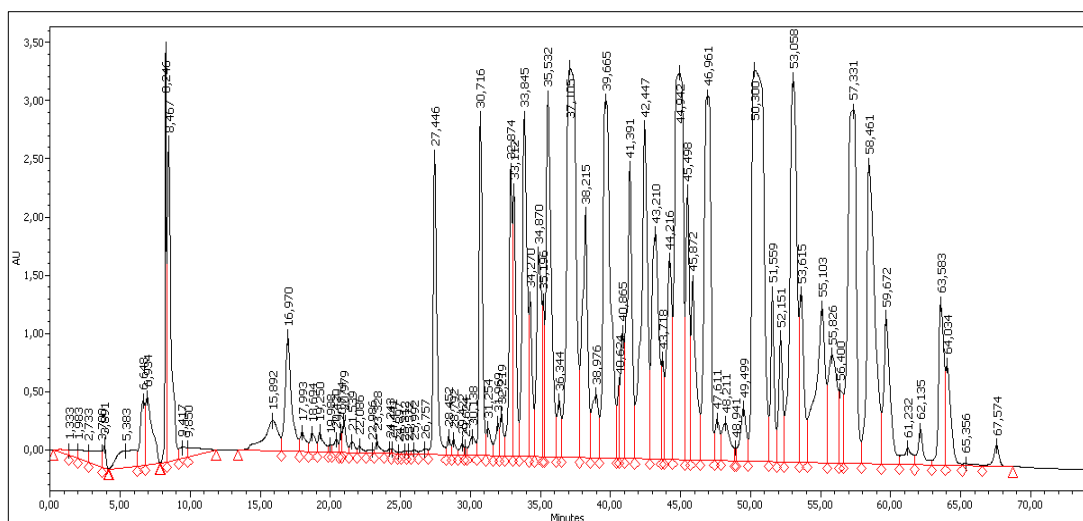


Figura 19. Cromatograma del extracto sólido de la rana *Agalychnis spurrelli* SC 25349 en solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,12% (V/V).

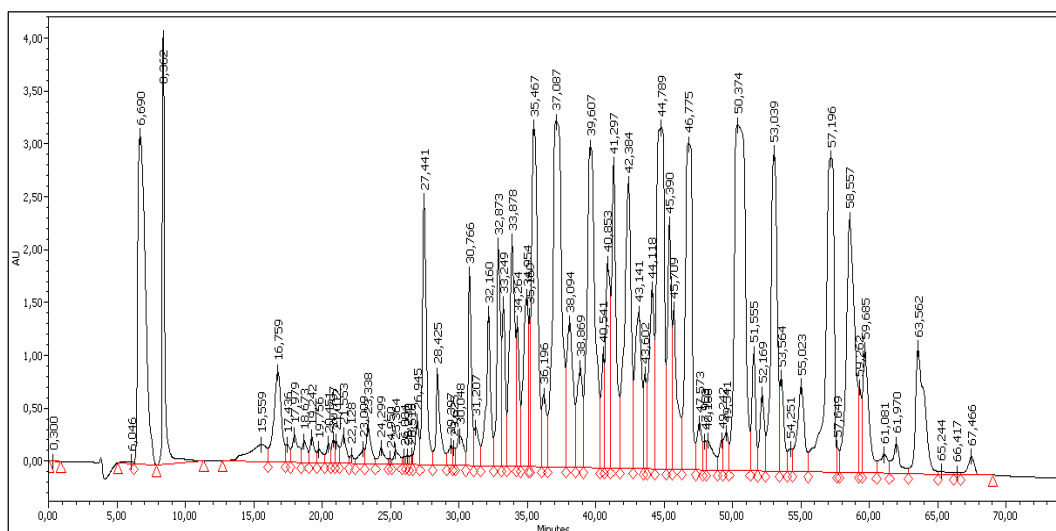


Figura 20. Cromatograma del extracto sólido de varias ranas *Agalychnis spurrelli* en solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,12% (V/V).

3.4. Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se realizó con las fracciones obtenidas durante las corridas cromatográficas de muestras sólidas unidas de secreciones cutáneas; las siembras se desarrollaron en un cuarto estéril, siguiendo todas las normas de seguridad para el manejo de las bacterias. Este proceso fue ejecutado por una estudiante de Biología como disertación de grado dentro del proyecto.

En las Tablas 4 y 5 se presentan los resultados de esta sección del trabajo, definiendo las fracciones con actividad antimicrobiana en las proporciones 30Péptido/70Bacteria, y 25Péptido/75Bacteria respectivamente. En las tablas se especifica si la bacteria es de tipo Gram positiva o Gram negativa, el nombre de la bacteria, seguido de las iniciales asignadas de las cepas y aislados, las mismas que tienes un nombre asignado descrito al final de las tablas (**). Enseguida se puede notar el número ordinario asignado a cada fracción recolectada después de la separación cromatográfica con el tiempo de inicio de su colección (tiempo de retención), y momento en que la fracción fue eluida de la columna.

Luego de las lecturas obtenidas de cada siembra, cada fracción que mostró resistencia (R) o susceptibilidad (S) frente a cada cepa o aislado por triplicado se le designa una de estas letras, logrando un total (T) de cepas y aislados que evidenciaron susceptibilidad por cada fracción. Los resultados determinan que a partir de la fracción 38 se deben elaborar pruebas para su liofilización, debido a que presentan un porcentaje alto de efectividad de inhibición en el crecimiento bacteriano a pesar de la utilización de una cantidad mínima de fracción.

Tabla 4. Fracciones efectivas para la inhibición del crecimiento de bacterias en proporción 30Péptido/70Bacteria.

Tipo		Gram Negativa										Gram Positiva									
Bacteria		<i>E. coli</i>										<i>S. enterica</i>		<i>S. aureus</i>							
*** Cepas o Aislados		C1	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	*T	C1	T	C1	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	T
Fracción No.	**T.R. (min)																				
1	3	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
2	4	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
3	5	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
4	6	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
5	7	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
6	8	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
7	9	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
8	10	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
9	11	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
10	12	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
11	13	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
12	14	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
13	15	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
14	16	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
15	17	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
16	18	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
17	19	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
18	20	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
19	21	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
20	22	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
21	23	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
22	24	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
23	25	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
24	26	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
25	27	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
26	28	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
27	29	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
28	30	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
29	31	S	R	R	R	S	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
30	32	S	R	R	R	S	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
31	33	S	R	R	R	S	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
32	34	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
33	35	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
34	36	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
35	37	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
36	38	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
37	39	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
38	40	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
39	41	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
40	42	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
41	43	S	R	S	R	S	R	R	R	3	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
42	44	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
43	45	S	S	S	R	S	R	S	S	6	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
44	46	S	S	S	S	S	R	S	S	7	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
45	47	S	S	S	R	R	S	S	S	6	S	1	S	R	R	R	R	R	R	R	1
46	48	S	R	S	R	R	S	R	R	3	S	1	R	R	R	R	R	R	R	R	0
47	49	R	R	S	R	R	S	R	R	2	S	1	S	R	R	R	R	R	R	R	1
48	50	R	R	S	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
49	51	S	R	S	R	R	S	R	R	3	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
50	52	S	R	S	R	S	R	R	R	3	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
51	53	S	S	S	R	S	R	R	R	4	S	1	S	R	R	R	R	R	R	R	1
52	54	S	R	S	R	S	R	R	S	4	S	1	S	S	S	S	S	S	S	S	7
53	55	S	R	S	R	S	S	R	S	5	S	1	S	S	S	R	R	R	R	R	4
54	56	S	R	S	R	S	R	R	S	4	S	1	S	S	S	R	R	R	R	R	4
55	57	S	R	S	R	S	R	R	S	4	S	1	S	S	S	S	S	S	S	S	8
56	58	S	R	S	R	S	R	R	S	4	S	1	S	S	S	S	R	R	R	R	5
57	59	R	R	S	R	S	R	R	S	3	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
58	60	R	R	S	S	S	R	R	S	4	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
59	61	R	R	S	S	R	R	R	S	3	R	0	S	S	S	R	S	S	S	S	7
60	62	S	R	R	S	S	S	R	S	5	R	0	S	S	R	R	R	R	R	R	3
61	63	S	R	R	S	S	R	R	S	4	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
62	64	S	R	S	S	S	R	R	S	5	S	1	S	R	R	R	R	R	R	R	1
63	65	S	R	S	S	S	R	R	S	5	S	1	S	S	S	S	S	S	S	S	7
64	66	S	S	S	S	S	R	R	S	6	S	1	S	R	R	R	R	R	R	R	1
65	67	S	R	S	S	S	R	R	S	5	S	1	S	R	R	R	R	R	R	R	1
66	68	S	S	S	S	S	R	R	S	6	S	1	S	R	R	S	R	R	R	R	2
67	69	S	R	S	S	S	S	R	S	6	S	1	R	R	R	R	S	R	R	R	2
68	70	S	S	S	S	S	S	R	S	7	S	1	R	R	R	R	S	R	R	R	1
69	71	S	S	S	S	S	S	R	S	7	S	1	S	S	S	S	S	R	R	R	6
70	72	S	S	S	S	S	S	S	S	8	S	1	S	S	S	R	R	R	S	R	4

* T: Total de cepas o aislados susceptibles a la fracción

** T.R. : Tiempo de Retención

*** Cepas(C) o Aislados(A)

E. coli: (C1) ATCC25922; (A1)24EB-BLEE; (A2) 31EB-BLEE; (A3) 47EB-BLEE; (A4) 42EB-BLEE; (A5)45EB-BLEE; (A6)51EB-BLEE; (A7)37EB-BLEE

S. enterica: (C1) ATCC 13076

S.aureus: (C1) ATCC25923; (A1) 85 SAUR; (A2) 52 SAUR; (A3) 11 SAUR; (A4) 20A CORSA; (A5) 11A CORSA; (A6) 88 CORSA; (A7) 99 CORSA

Tabla 5. Fracciones efectivas para la inhibición del crecimiento de bacterias en proporción
25Péptido/75Bacteria.

Tipo		Gram Negativa										Gram Positiva									
Bacteria		<i>E. coli</i>										<i>S. enterica</i>		<i>S. aureus</i>							
Cepas o Aislados		C1	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	T	C1	T	C1	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	T
Fracción No.	T.R. (min)																				
1	3	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
2	4	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
3	5	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
4	6	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
5	7	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
6	8	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
7	9	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
8	10	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
9	11	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
10	12	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
11	13	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
12	14	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
13	15	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
14	16	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
15	17	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
16	18	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
17	19	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
18	20	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
19	21	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
20	22	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
21	23	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
22	24	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
23	25	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
24	26	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
25	27	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
26	28	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
27	29	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
28	30	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
29	31	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
30	32	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
31	33	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
32	34	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
33	35	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
34	36	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
35	37	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
36	38	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
37	39	S	R	R	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
38	40	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
39	41	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
40	42	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
41	43	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
42	44	S	R	S	R	R	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
43	45	S	S	S	R	R	R	S	R	4	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
44	46	S	R	S	S	S	R	R	R	4	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
45	47	S	S	S	R	R	S	R	S	5	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
46	48	R	R	S	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
47	49	R	R	S	R	R	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
48	50	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
49	51	R	R	S	R	R	R	R	R	1	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
50	52	R	R	S	R	S	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
51	53	R	S	S	R	R	R	R	R	2	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
52	54	R	R	S	R	S	R	R	R	2	R	0	R	R	R	S	S	R	R	R	2
53	55	R	R	S	R	S	R	R	R	2	R	0	S	S	S	R	R	R	R	S	4
54	56	R	R	S	R	S	R	R	R	2	R	0	S	S	R	R	R	R	R	R	2
55	57	R	R	S	R	S	R	R	R	2	R	0	S	R	R	S	S	R	R	R	3
56	58	S	R	S	R	S	R	R	R	3	R	0	S	S	S	R	R	R	R	S	4
57	59	R	R	S	R	R	R	R	R	1	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
58	60	R	R	S	R	S	R	R	R	2	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
59	61	R	R	R	S	R	R	R	R	1	R	0	S	S	S	R	S	S	S	R	6
60	62	R	R	R	R	R	R	R	R	0	R	0	R	S	R	R	R	R	R	S	2
61	63	R	R	R	R	S	R	R	R	1	R	0	R	R	R	R	R	R	R	R	0
62	64	R	R	S	R	S	R	R	R	2	S	1	R	R	R	R	R	R	R	R	0
63	65	R	R	S	R	S	R	R	R	2	R	0	S	S	S	R	S	S	R	S	6
64	66	R	R	R	R	S	R	R	R	1	R	0	S	R	R	R	R	R	R	R	1
65	67	R	R	R	R	S	R	R	S	2	S	1	S	R	R	R	R	R	R	R	1
66	68	R	R	R	R	S	R	R	S	2	S	1	S	R	R	R	R	R	R	R	1
67	69	R	R	R	R	S	R	R	S	2	S	1	S	R	R	R	R	R	R	R	1
68	70	R	R	S	R	S	R	R	S	3	S	1	S	R	R	R	R	R	R	R	1
69	71	R	R	S	S	S	R	R	S	4	S	1	S	R	S	R	S	R	S	R	4
70	72	R	R	S	S	S	R	S	S	5	S	1	S	R	S	R	R	R	R	R	2

* T: Total de cepas o aislados susceptibles a la fracción

** T.R.: Tiempo de Retención

*** Cepas(C) o Aislados(A)

E. coli: (C1) ATCC25922; (A1) 24EB-BLEE; (A2) 31EB-BLEE; (A3) 47EB-BLEE; (A4) 42EB-BLEE; (A5) 45EB-BLEE; (A6) 51EB-BLEE; (A7) 37EB-BLEE

S. enterica: (C1) ATCC 13076

S. aureus: (C1) ATCC25923; (A1) 85 SAUR; (A2) 52 SAUR; (A3) 11 SAUR; (A4) 20A CORSA; (A5) 11A CORSA; (A6) 88 CORSA; (A7) 99 CORSA

3.5. Liofilización de las fracciones

Se tuvo ciertas dificultades para la liofilización de fracciones, ya que el equipo al parecer estaba provisto únicamente para la liofilización de muestras exclusivamente acuosas, y las fracciones debido a que son obtenidas por HPLC, además de agua contenían acetonitrilo y ácido trifluoroacético en proporciones distintas por su separación en gradiente.

Las primeras pruebas que se realizaron fueron el aumento de horas en la fase de congelamiento, ya que si no existe una muestra completamente sólida al empezar la fase de sublimación, el equipo se detiene automáticamente y acciona una alarma debido a que el equipo no puede llegar a la presión indicada en la receta diseñada; también se probó disminuyendo el volumen a la mitad por muestra colocadas en cajas petri para que exista mayor área de contacto de la muestra en el plato tanto para la congelación como para el tratamiento termal. Finalmente, se efectuaron diluciones acuosas de las fracciones en factores de 2 y 5x con el fin de disminuir las concentraciones de acetonitrilo y ácido trifluoroacético, de esta manera el punto de solidificación de las soluciones aumentaría y se podría dar el congelamiento total de la solución para que el liofilizador prosiga con la etapa de secado.

Todas las pruebas funcionaron una o dos veces pero no se logró resolver el problema, el equipo seguía deteniéndose ya que no llegaba a la presión indicada en la receta para empezar el tratamiento de secado, por lo que con los técnicos se determinó que el problema era la presencia de estos solventes en las muestras y que no permitía que la bomba de vacío opere adecuadamente.

Con asesoría técnica, se propone la compra de una trampa de Nitrógeno líquido, el cual se conecta entre la bomba de vacío y la cámara de liofilización, para garantizar el congelamiento total de las soluciones, sin que los solventes que forman parte de éstas no ocasionen algún daño irreversible en los elementos de la bomba de vacío así como en las mangueras de unión y demás componentes del equipo, razón por la que se detiene la elaboración de una receta para la liofilización óptima de las fracciones.

En la Figura 21 se ilustra el registro de datos gráficos de un proceso que concluyó exitosamente, mostrando una curva comparable con la obtenida en la liofilización de las secreciones. Consecuentemente, se encuentra la Figura 22 que expone una curva en la que el procedimiento no se completó, mostrando claramente que la presión no llega a la programada, motivo por el cual se suspende el proceso de liofilización.

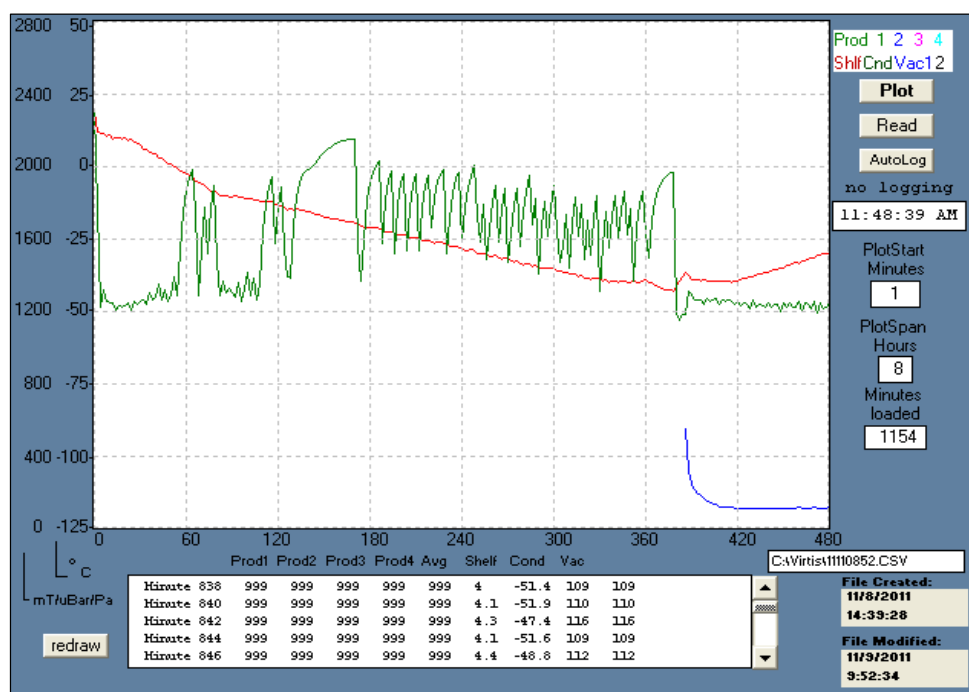


Figura 21. Gráfico del proceso de liofilización de fracciones obtenidas por HPLC.

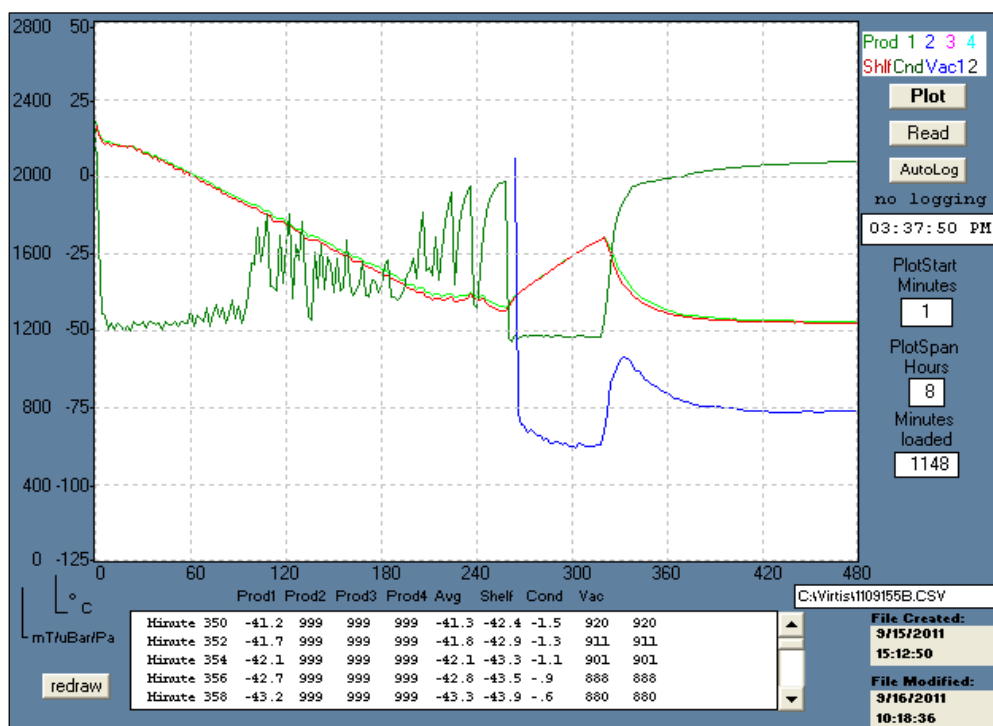


Figura 22. Gráfico del proceso de liofilización incompleto de fracciones obtenidas por HPLC.

De las liofilizaciones que se pudieron completar, se obtuvo fracciones sólidas aunque no se consiguió un peso exacto por volumen ya que el proceso no era óptimo, parte del liofilizado se perdió porque se llegó a pegar a los platos de tratamiento termal. Sin embargo, se pudo obtener el peso necesario para realizar pastillas de 14 fracciones.

En la Tabla 6 se muestra el peso total obtenido por fracción después del proceso de liofilización, las 14 fracciones que dieron un peso considerable para la elaboración de las pastillas son: 44, 45, 46, 47, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 59, 60, y 63.

Tabla 6. Peso total obtenido de Fracciones efectivas para la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, y *Staphylococcus aureus*.

Fracción No.	*T.R. (min)	Peso (g)
38	40	0.0003
39	41	<0.0001
40	42	0.0003
41	43	0.0002
42	44	0.0005
43	45	0.0002
44	46	0.0041
45	47	0.0025
46	48	0.0036
47	49	0.0001
48	50	0.0001
49	51	0.0017
50	52	0.0033
51	53	0.0008
52	54	0.0031
53	55	0.0026
54	56	0.0022
55	57	0.0018
56	58	0.0030
57	59	0.0012
58	60	<0.0001
59	61	0.0022
60	62	0.0028
61	63	0.0002
62	64	0.0005
63	65	0.0020
64	66	0.0001
65	67	0.0002
66	68	<0.0001
67	69	<0.0001
68	70	<0.0001
69	71	<0.0001
70	72	<0.0001

* T.R. : Tiempo de retención

Volumen aproximado liofilizado ~30mL

3.6. Análisis Espectrofotométrico

Para la preparación de pastillas con Bromuro de Potasio se necesita al menos un miligramo de muestra, por lo que se pudo preparar únicamente 14 pastillas, dos o tres por cada fracción. Además, se preparó el blanco, la pastilla se realiza únicamente con Bromuro de Potasio para realizar el background el cual elimina cualquier señal que del aire, así como el portamuestra o algún contaminante que pueda tener el Bromuro de Potasio. La Figura 23 se muestra el espectro correspondiente al blanco.

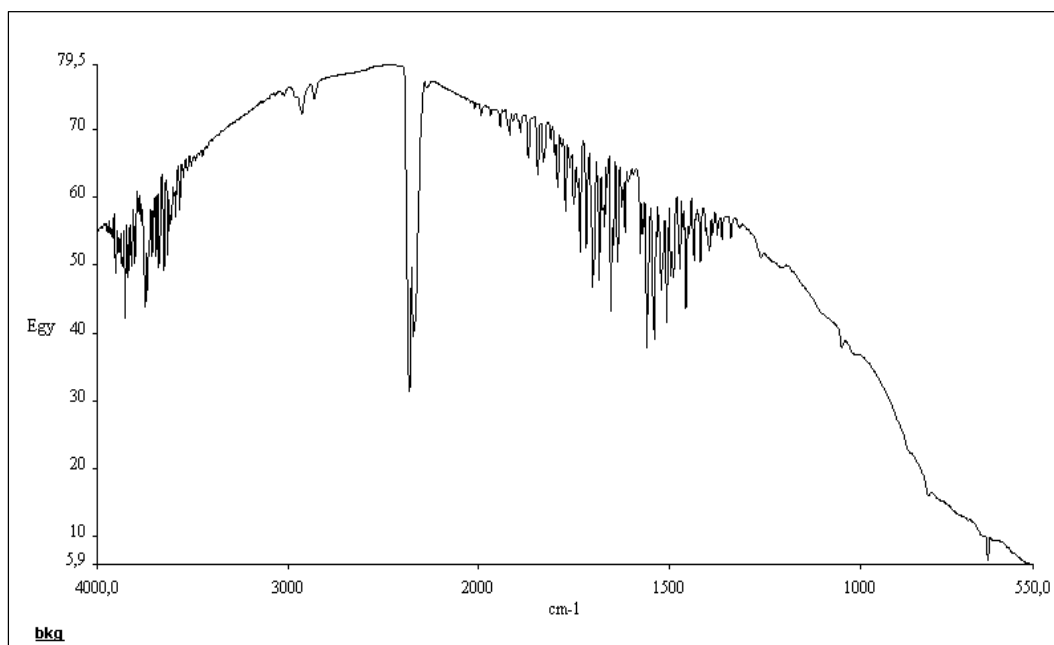


Figura 23. Espectro del Blanco, Bromuro de Potasio grado espectrométrico (Background).

El espectro es similar al que muestra el background del aire, lo que evidencia que el porta muestra no produce ninguna interferencia, así como el bromuro de potasio no presenta ningún contaminante residual garantizando el grado espectrométrico que posee.

Posteriormente, en la Figura 24 se expone uno de los espectros obtenidos de las 14 fracciones que se empastillaron por presentar actividad antimicrobiana en los ensayos microbiológicos; para la lectura de dichas fracciones, se liofilizó y con el sólido obtenido, se prepararon pastillas por triplicado con Bromuro de Potasio. Todos los espectros de las demás fracciones se adjuntan en el Anexo 5, éstas mostraron espectros muy similares y sin diferencias considerables.

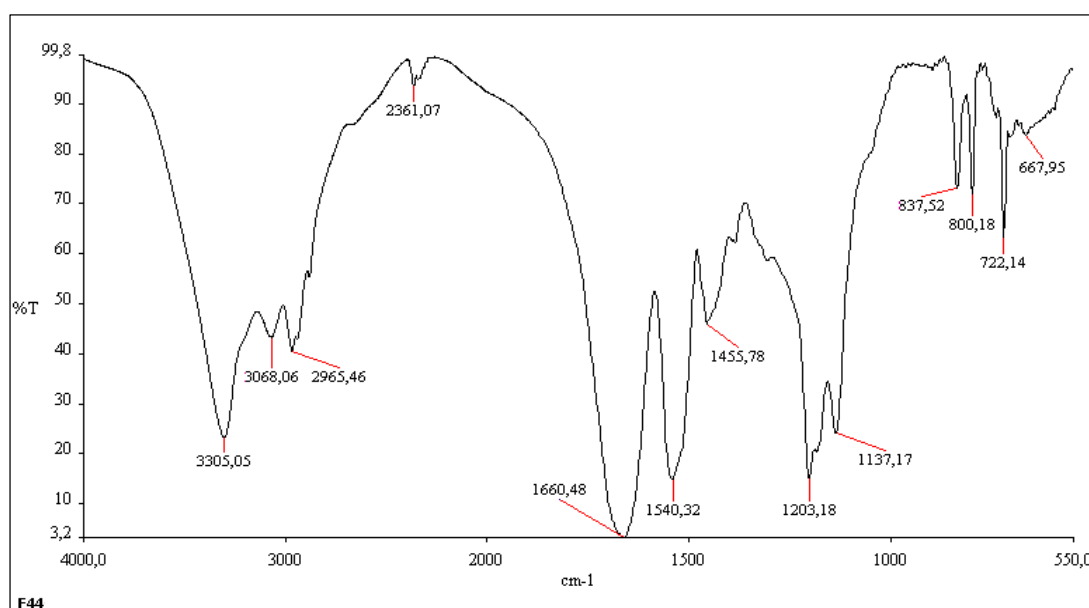


Figura 24. Espectro de la Fracción No.44, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.

En el espectro se distingue el pico ubicado en los 3305.05cm^{-1} , correspondiente a la vibración de tensión del enlace N-H en las amidas. Otra banda importante es la ubicada en los 1660.48cm^{-1} la cual se produce por la tensión del enlace C=O (banda Amida I) y vibraciones del enlace C=C, así como la banda situada en 1540.32cm^{-1} producida por vibraciones de tensión de N-C simétrico, y de flexión del enlace N-H cuando se trata de

una amida secundaria (banda Amida II).

De acuerdo a publicaciones científicas [48-50] en donde se realizaron estudios con péptidos por Espectrofotometría de Infrarrojos y espectrometría Láser Raman, se compararon espectros asignando provisionalmente estructuras secundarias del tipo β laminar con respecto a vibraciones entre 1620 a 1690 cm^{-1} , por lo que al realizar la comparación con los espectros obtenidos en este estudio se puede estipular esta estructura debido a la presencia de un pico dentro del rango.

A partir de los espectros de Infrarrojos, también se puede deducir que la técnica aplicada en la separación de secreciones cutáneas por HPLC es la adecuada debido a que la identificación de las fracciones como péptidos es certero, asegurando así al método como exclusivo para esta clase de compuestos y no por ejemplo para moléculas estructuralmente similares como son las aminas biogénicas, a las que se debería implantar una técnica exclusiva para su estudio.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Se logró confirmar la presencia de péptidos en secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli*, ya que los espectros obtenidos por FT-IR muestran bandas características de una amida secundaria.

La optimización del método de separación de las secreciones cutáneas obtenidas es aceptable ya que los cromatogramas resultantes son similares, con picos en tiempos de retención similares y el método microbiológico aplicado a las fracciones fue reproducible.

Las 14 fracciones con actividad antimicrobiana que se lograron leer por Espectrofotometría de Infrarrojo presentaron bandas características de tensión y flexión de enlaces entre Carbono, Hidrógeno, Oxígeno y Nitrógeno comunes en presencia de una amida.

Se determina a los compuestos activos en el exudado de la rana *Agalychnis spurrelli* como péptidos ya que todos los espectros mostraron vibraciones de tensión del enlace N-H entre $3300 - 3060\text{cm}^{-1}$, y vibraciones de tensión y flexión para los enlaces C=O y N-H respectivamente entre $1630 - 1510\text{cm}^{-1}$, rangos específicos para una amida secundaria.

En comparación a distintas publicaciones científicas, en donde realizan un análisis espectrométrico utilizando FT-IR y Láser Raman, se puede dar una asignación provisional a este tipo de péptidos como una estructura secundaria del tipo β laminar.

No existen diferencias significativas entre espectros IR al compararlos entre ellos, por lo que únicamente se puede dar un análisis estructural de este tipo de compuestos.

4.2. Recomendaciones

Se sugiere utilizar otras técnicas como espectrometría Raman o Resonancia Magnética Nuclear para la determinación estructural específica de los péptidos, ya que pueden proveer de espectros tridimensionales en donde se puede observar características mayormente definidas de las moléculas y de este modo saber con certeza el modo de acción de éstas contra bacterias, hongos y células cancerígenas.

Se propone recromatografiar las fracciones que dieron positivo en las pruebas de susceptibilidad microbiana con otro tipo de columna y determinar su masa molecular por espectrometría de masas LC-MS, (MALDI-TOF).

Se plantea el estudio sobre sinergismo entre fracciones con actividad antimicrobiana para determinar si existe la posibilidad de ampliar el rango de efectividad contra bacterias, hongos y células cancerígenas.

Los péptidos son moléculas complejas que poseen ordenamientos distintos de aminoácidos que les confieren propiedades físico químicas propias, por lo que se recomienda definir la secuencia de cada fracción a través de un fraccionador de proteínas ya que de acuerdo a los aminoácidos que lo componen y su eficiencia de acoplamiento, dependería directamente la posibilidad de su síntesis.

Se propone proseguir con este tipo de investigaciones de anfibios en el país y resaltar la importancia de éstos en su hábitat, su conservación y protección, ya que pueden ser el cimiento de una nueva gama de medicamentos alternos que no generen una evolución de bacterias, hongos y células malignas en sus mecanismos de resistencia antibiótica.

Se recomienda la adquisición de un filtro de Nitrógeno Líquido para la liofilización de fracciones en el caso de su necesidad para análisis posteriores con el fin de evitar el desgaste acelerado de la bomba de vacío así como otros componentes de equipo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Proaño C., (2004). *Ocurrencia de compuestos antimicrobiales secretados por la piel de algunos anfibios de las familias: Hylidae, Dendrobatidae, Ranidae, y purificación parcial de 5 péptidos antimicrobianos de Agalychnis spurrelli (Hylidae: Anura)*, Tesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.
- [2] Cipriani I., (2006). *Análisis de epibatidina en pieles de Dendrobatidos Ecuatorianos*, Tesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.
- [3] Caicedo A., (2007). *Análisis de secreciones peptídicas de anfibios ecuatorianos con pruebas de susceptibilidad en bacterias patógenas*, Tesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.
- [4] Torres D., (2009). *Actividad antifúngica de los péptidos de la piel de Agalychnis spurrelli sobre hongos fitopatógenos*, Tesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.
- [5] Ramirez G., (2012). *Detección de fracciones peptídicas con actividad antimicrobiana extraídas de secreciones cutáneas de Agalychnis spurrelli (Anura: Hylidae)*, Tesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.
- [6] Duellman, W. E. y Trueb, L. (1994) *Biology of Amphibians*, Johns Hopkins Paperbacks edition, Baltimore, London.
- [7] Hickman C., Roberts L., Larson A. (2001), *Integrated Principles of Zoology*, McGraw-Hill Publishing Co
- [8] Gouts N. y Salomone F., (N.A.). Historia evolución y descripción de Anfibios, <http://www.alihuen.org.ar/fauna-pampeana/historia-evolucion-y-descripcion-de-anfibios.html>, 2 de febrero de 2011.

- [9] Hedges, S. y Maxson L., (1993). *A molecular perspective on Lissamphibian phylogeny*, Pennsylvania State University, USA, Herpetol. Monogr.7:27-42.
- [10] Feller, A. E. y S. B. Hedges., (1998). *Molecular evidence for the early history of living amphibians*, Pennsylvania State University, USA, Mol. Phylogenet. Evol. 9:509-516.
- [11] Ruta, M. y Coates, M. I. (2007). Dates, nodes and character conflict: addressing the lissamphibian origin problem. *Journal of Systematic Palaeontology*, USA, 5: 69-122.
- [12] Carroll, R. L. (2007) The Palaeozoic Ancestry of Salamanders, Frogs and Caecilians. *Zoological Journal of the Linnean Society*, USA, 150: 1-140.
- [13] AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. (2011). Berkeley, California, <http://amphibiaweb.org/>, 2 de febrero de 2011.
- [14] Encyclopedia Britannica Inc., Encyclopedia Britannica Online, (2011). Chicago, Illinois, <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/21445/amphibian>, 03 de abril de 2011.
- [15] Coloma, L. A., (2009). Anfibios de Ecuador. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador, <http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/amphibiawebec/anfibiosecuador/index.html>, 5 de febrero de 2011.
- [16] Bertonatti, C. (1994). Lista Propuesta de Anfibios y Reptiles Amenazados de Extinción. *Cuadernos de Herpetología*, 8 (1): 164-171.
- [17] Maneyro R., Camargo A., da Rosa I., Clase Amphibia, Facultad de Ciencias Sección Zoología de Uruguay, http://zvert.fcien.edu.uy/nuevos_cursos/practico_04_anfibios.pdf, 3 de abril de 2011.
- [18] Stebbins R. y Cohen N., (1997). *A Natural History of Amphibians*, University Presses of California, Columbia and Princeton, USA.

- [19] Goraya. J., Wang. Y., Li. Z., O'Flaherty. F., O'Flaherty. M., Floyd. C., (2000). Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American : frogs, *Rana Luteiventris*, *Rana Barlandieri* and *Rana Pipiens*, ***European Journal of Biochemistry*** 247: 894-900.
- [20] AmphibianArk: Conservation Breeding Specialist Group (2008). <http://www.amphibianark.org/>, 5 de febrero de 2011.
- [21] Simmaco. M., Mignogna. M., Barra. D., Boman. A., Boman. H., (1998). Experimental Infections of rana Esculenta with Aeromonas hydrophila: A molecular mechanism for the control of the normal flora, ***Scandinavian Journal of Immunology***, 48: 357-363.
- [22] Godfrey, K., (2009). The gliding ability of Agalychnis spurrelli (Anura: Hylidae) and the significance of size and morphology. ***Manchester Museum***. <http://frogblogmanchester.files.wordpress.com/2009/04/agalychnis-spurrelli.pdf>. 2 de febrero de 2011.
- [23] Ortega-Andrade M., (2008). Agalychnis spurrelli Boulenger (Anura, Hylidae): Variación, Distribución y Sinonimia. ***Papéis Avulsos de Zoologia***, Vol.48 (13), 103-117.
- [24] Bohinsky R., (1991). ***Bioquímica***, 5^{ta} edición, Addison – Wesley Iberoamericana, S.A., Delaware.
- [25] Nelson D., Cox M., (2009). ***Principios de Bioquímica***, 5^{ta} edición, Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- [26] Mathews C., Van Holde K., Ahern K., (2002). ***Bioquímica***, 3^{era} edición, Pearson Educación, S.A., Madrid.
- [27] Wilbraham A. y Matta M., (1989). ***Introducción a la Química Orgánica y Biología***, 1^{era} edición, Sistemas Técnicos de Edición, México D.F.
- [28] Boyer R., (2002). ***Concepts in Biochemistry***, 2^{da} edición, Thomson Learning, Canada.

- [29] White A., Handler P., Smith E., Stetten D., (1954). *Principles of Biochemistry*, McGraw-Hill Company, Inc., New York.
- [30] Curso de Biomoléculas, Universidad del País Vasco (2010), <http://www.ehu.es/biomoleculas/index.htm>, 3 de abril de 2011.
- [31] Tellez, G. y Castano, J., (2010). Antimicrobial peptides. *Revista Infectio*, Vol.14 (1), 55-67, Universidad del Quindío, Armenia.
- [32] Kamysz W., Okrój M., y Łukasiak J., (2003). Novel properties of antimicrobial peptides, *Acta Biochimica Polonica*, Vol.50 (2), 461–469, Polonia.
- [33] Rivas S., Sada E., Hernández-Pando R., Tsutsumi V., (2006) Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas, Salud Pública de México, <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=10648109>, 3 de abril de 2011.
- [34] Zhao H., (2003). *Mode of Action of Antimicrobial Peptides*, Academic Dissertation, University of Helsinki, Finland.
- [35] Hancock R., Sahl H., (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, Vol. 24, n.12, pp.1551-1557.
- [36] Orduz S., Gutierrez P., (2003). Péptidos antimicrobianos, estructura, función y aplicaciones. *Actualidades Biológicas*, Vol.25, fasc.78, pp.5-15.
- [37] Van't Hof W., Veerman E., Helmerhorst E., Amerongen A., (2001). Antimicrobial Peptides: Properties and Applicability. *Journal Biological Chemistry*, Vol. 382, pp. 597-619.
- [38] Castañeda-Casimiro J., Ortega J., Venegas A., Aquino A., Serafín J., Estrada S., Estrada I., (2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*, Vol. 18, Núm. 1, pp. 16-29.

- [39] Shai Y., (2002). Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides. **Wiley Periodicals, Inc. Biopolymers**, Vol. 66, pp. 236-248.
- [40] Gallo R., Huttner K., (1998). Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. **Journal of Investigative Dermatology**, n.111, pp.739-743.
- [41] Ramirez J., (2006) Liofilización de Alimentos, Universidad del Valle, <http://es.scribd.com/doc/31055971/4/DEFINICION-DE-LIOFILIZACION>, 01 de junio de 2011.
- [42] Waters: HPLC - High Performance Liquid Chromatography (2011). Milford, Massachusetts, <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919>, 8 de junio de 2011.
- [43] Rubinson K., Rubinson J., (2001). **Análisis Instrumental**, 1^{era} edición, Pearson Educación, S.A., Madrid.
- [44] Skoog D., Holler J., Nieman T., (2001). **Principios de Análisis Instrumental**, 5^{ta} edición, Mc Graw-Hill, Madrid.
- [45] Walton H., (2005). **Análisis Químico e Instrumental Moderno**, 1^{era} edición, Editorial Reverté S.A., Barcelona.
- [46] Sierra I., Pérez D., Gómez S., Morante S., (2010). **Análisis Instrumental**, 1^{era} edición, Producción Editorial Gesbiblo, S.L., España.
- [47] Marenah L., Shaw C., Orr D., McClean S., Flatt P., Abdel-Wahab Y., (2004). Isolation and characterisation of an unexpected class of insulinotropic peptides in the skin of the frog *Agalychnis litodryas*. **Regulatory Peptides**, v.120, pp. 33-38.
- [48] Benaki D., Aggeli A., Chryssikos G., Yiannopoulos Y., Kamitsos E., Brumley E., Case S., Boden N., Hamodrakas S., (1998). Laser-Raman and FT-IR spectroscopic studies of peptide-analogues of silkworm chorion protein segments. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.23, pp. 49-59.

[49] Bredenbeck J., y Hamm P., (2003). Peptide structure determination by two-dimensional infrared spectroscopy in the presence of homogeneous and inhomogeneous broadening. *Journal of Chemical Physics*, v. 119, n. 3, pp. 1569-1578.

[50] Smith A., y Tokmakoff A., (2007). Amide I two-dimensional infrared spectroscopy of β -hairpin peptides. *Journal of Chemical Physics*, n.126, 045109, pp 1-11.

ANEXOS

ANEXO 1. Series de campo correspondiente a los especímenes de *Agalychnis spurrelli* empleados para la obtención de secreciones cutáneas.

Número	Especie	Serie de Campo
1	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 27297
2	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 27298
3	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 27299
4	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 27300
5	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15748
6	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15876
7	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15878
8	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15879
9	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15880
10	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26515
11	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26516
12	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26517
13	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15886
14	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15887
15	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15889
16	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15891
17	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15892
18	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15894
19	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15896
20	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15900
21	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15902
22	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26518
23	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26519
24	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 15932
25	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26349
26	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26350
27	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26352
28	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26353
29	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26354
30	<i>Agalychnis spurrelli</i>	SC 26355

ANEXO 2. Copia del permiso de colección de anfibios para el proyecto en el que se desarrolló la investigación por un año calendario (2007-2008).



PERMISO DE INVESTIGACION CIENTÍFICA

No 15
Fecha: 5 de febrero de 2007

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a la Dra. Iliana Alcocer Negrete, Cl. No 1710490143 de nacionalidad ecuatoriana, para que lleve a cabo la investigación "**Colección de anfibios del grupo anura para el Proyecto CARACTERIZACION DE LAS SECRESIONES CUTÁNEAS de Agalychnis litodryas (ANURA HYLIDAE.)**"

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitado por: Dra. Iliana Alcocer Negrete
2. Nombre del funcionario responsable de la valoración técnica del proyecto: Ing. Abel Olaya Mariño, LIDER DE BIODIVERSIDAD DE ESMERALDAS MA.
3. Nombre de la Institución Científica Extranjera Auspiciante: No califica.
4. Nombre de la Institución Científica Nacional Auspiciante: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
5. Bajo Monitoreo de: (Líder de Biodiversidad) del Ministerio del Ambiente, Dirección Regional de Esmeraldas.
6. Complementos autorizados de la Investigación:
 - colección: de muestras.
 - identificación de campo con liberación.
 - uso de redes, trampas.
7. Duración de :
 - la investigación: (3 años calendarios)
 - permiso de investigación: 1 año calendario (de 5 de febrero de 2007 hasta 5 de febrero de 2008)
8. Obligaciones del investigador:
 - Entregar 3 copias de los resultados finales de la investigación en castellano, incluyendo una copia de las fotografías que formen parte de la investigación (Art. 9 Libro lit. b) IV TULAS)
 - en caso de renovación del permiso anual de investigación, se debe presentar un informe de avance de la investigación en castellano

El plazo de entrega del informe vence: 5 de abril de 2008


Dr. Mauricio Angulo Ayoví
DIRECTOR TÉCNICO DE ÁREA - JEFE DE
DISTRITO FORESTAL 1 DE ESMERALDAS MA
Cc. Archivo

Av. Pedro Vicente Maldonado y Manuela Cañizares Edf. del MAG. Piso 2
Teléfonos: 2721-781; 2723-204

OBSERVACIONES CORRESPONDIENTES A LAS ESPECIFICACIONES DE LA AUTORIZACIÓN EN LA PRIMERA PÁGINA:

ESTA AUTORIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS EXPRESADOS Y APROBADOS EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, POR TANTO NO HABILITA EXPORTACIÓN O MOVILIZACIÓN DE FAUNA.

SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LAS PROVINCIAS QUE SE RESALTAN A CONTINUACIÓN: CARCHI, IMBABURA, PICHINCHA, NAPO, SUCUMBIOS, MORONA SANTIAGO, COTOPAXI, CHIMBORAZO, AZUAY, LOJA, TUNGURAHUA, PASTAZA, ZAMORA CHINCHIPE, MANABI, ESMERALDAS, GUAYAS, LOS RÍOS, EL ORO Y SANTA ELENA.

SE AUTORIZA LA COLECCIÓN E INVESTIGACIÓN DE ESPECIMENES ZOOLOGICOS DE: Aves, Mamíferos, Anfibios, Reptiles e Insectos EN LAS ZONAS ESPECIFICADAS EN EL PARRAFO ANTERIOR CON EL PROPÓSITO DE OBTENER DATOS BIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS, INVENTARIAR DIVERSIDAD DE ESEPECIES, CARACTERIZACION GENETICA Y DESCRIBIR NUEVAS ESPECIES, EN LAS PROVINCIAS ESPECIFICADAS EN EL PÁRRAFO ANTERIOR.

EN EL CASO DE ENCONTRARSE NUEVAS ESPECIES, DEBERÁ NOTIFICARSE A LA DIRECCIÓN NACIONAL DE BIODIVERSIDAD PARA LA RESPECTIVA AUTORIZACIÓN DE SU PUBLICACIÓN. LOS TIPOS DEBERÁN DEPOSITARSE EN EL MUSEO DE ZOOLOGÍA QCAZ DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR.

PARA EL INGRESO A AREAS DE PROPIEDAD PRIVADA EL INVESTIGADOR DEBERÁ COORDINAR CON EL RESPECTIVO PROPIETARIO.

PARA EL INGRESO A AREAS RPOTEGIDAS, LOS INVESTIGADORES DEBERAN COORDINAR CON EL RESPECTIVO RESPONSABLE DE AREA.

PARA LA MOVILIZACIÓN DE TODOS LOS EJEMPLARES COLECTADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN, EL INVESTIGADOR DEBERA CONTAR CON LA RESPECTIVA ORDEN DE MOVILIZACIÓN EMITIDA POR LAS DIRECCIONES PROVINCIALES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.

DE EXISTIR RETRAZO EN LA ENTREGA DE INFORMES PARCIALES O FINALES SE SOLICITARÁ PRORROGA QUINCE DIAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.

IAS MUESTRAS O DATOS OBTENIDOS PRODUCTO DE INVESTIGACIÓN NO PODRÁN SER UTILIZADAS EN CUALQUIER ACTIVIDAD DE BIOPROSPECCIÓN NI ACCESO A RECURSO GENÉTICO.

NINGÚN ESPÉCIMEN PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN PODRA SER UTILIZADO PARA USO COMERCIAL O COMO MATERIAL PARA MANEJO INSITU / EXSITU, SIN LA CORRESPONDIENTE AUTORIZACIÓN DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.

ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAIDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACION DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.

EL REGISTRO DE LA LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS ESPECIMENES COLECTADOS U OBSERVADOS ASÍ COMO FOTOGRAFÍAS, INFORME PARCIAL O FINAL DEBERÁ SER ENTREGADO EN FORMATO ESTABLECIDO FÍSICO Y DIGITAL PDF, PARA SU INGRESO AL CIBE (INCLUYENDO INFORMACIÓN SOBRE LAS COORDENADAS GEOGRÁFICAS) Y PARA A LA PÁGINA WEB DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.

TODOS USOS INDEBIDOS DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE AREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA.

TASA POR AUTORIZACIÓN: 260 DOCIENTOS SESENTA DÓLARES DEPOSITADOS CON PAPELETA No. 0092429 DEL 13 DE FEBRERO DEL 2009 EN EL BANCO NACIONAL DE FOMENTO CUENTA 0010000785.

ANEXO 3. Copia del permiso de colección de anfibios para el proyecto en el que se desarrolló la investigación por un año calendario (2009-2010).



AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTÍFICA

Nº 008-09 IC-FAU-DNB/MA

FLORA

FAUNA X

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a Santiago Ron, Documento de Identidad, Cédula 1711059137, Luis Coloma, Documento de Identidad, Cédula No.1706893300, Juan Manuel Guayasamin, Documento de Identidad, Cédula No. 170636098-7, Elisa Bonaccorso, Documento de Identidad, No. Alvaro Barragan Documento de Identidad, Cédula No. 1711585511, Santiago Burneo Documento de Identidad, Cédula No. 1711685816, Omar Torres, Documento de Identidad, Cédula No. 1712335916 para que lleven a cabo la investigación "Plan de Colecta Anual del Museo de Zoología QCAZ de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador- P.M. FAU-001-DNB/VS".

De acuerdo a las siguientes especificaciones:


- 1.- Solicitud de: Laura Arcos Terán, Decana de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- 2.- Valoración técnica del proyecto: Gabriela Montoya.
- 3.- Auspicio de Institución Científica Extranjera: Ninguna
- 4.- Auspicio de Institución Científica Nacional: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- 5.- Contraparte del Ministerio del Ambiente: Coordinadores de Patrimonio Natural de las Direcciones Provinciales establecidas en la parte posterior de esta Autorización.
- 6.- Complementos Autorizados de la Investigación: Colección e Investigación de Especímenes Zoológicos de: Aves, Mamíferos, Anfibios, Reptiles e Insectos.
- 7.- Duración: enero de 2009 al 26 de febrero de 2010.
- 8.- Obligaciones del investigador: SE COMPROMETE A DEPOSITAR DUPLICADOS DE LAS COLECCIONES PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN EN EL MUSEO DE ZOOLOGÍA QCAZ DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR; ENTREGAR 3 (TRES) COPIAS DEL INFORME DE RENOVACIÓN Y/O FINAL, 1 (UNA) COPIA A CADA UNA DE LAS DIRECCIONES PROVINCIALES DE LOS RESULTADOS DE ESTA INVESTIGACIÓN EN ESPAÑOL, IMPRESO Y DIGITAL EN FORMATO PDF, INCLUYENDO LA LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS ESPECÍMENES COLECTADOS U OBSERVADOS, UNA COPIA DE LAS FOTOGRAFÍAS QUE FORMEN PARTE DE LA INVESTIGACIÓN EN FORMATO DIGITAL AL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
EL PLAZO DE ENTREGA DEL INFORME VENCE EL 26 DE FEBRERO DEL 2010.
- 9.- Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el párrafo anterior se responsabiliza:
Laura Arcos Terán, Decana de la Facultad de Ciencias Exactas y Juan Manuel Guayasamin Investigador, Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Wilson Rojas
Director Nacional de Biodiversidad

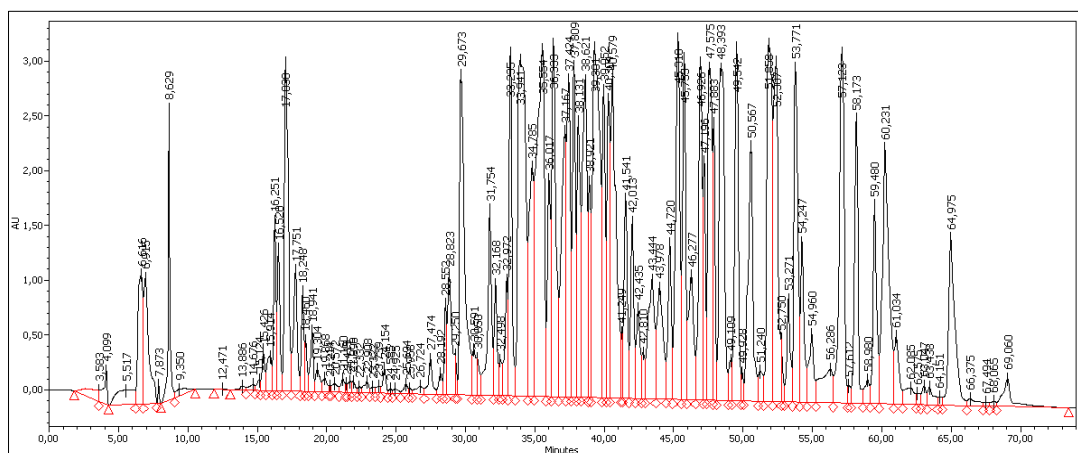
GM 17/02/09
CC: Líderes de Biodiversidad

CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DEL PERMISO DE INVESTIGACIÓN

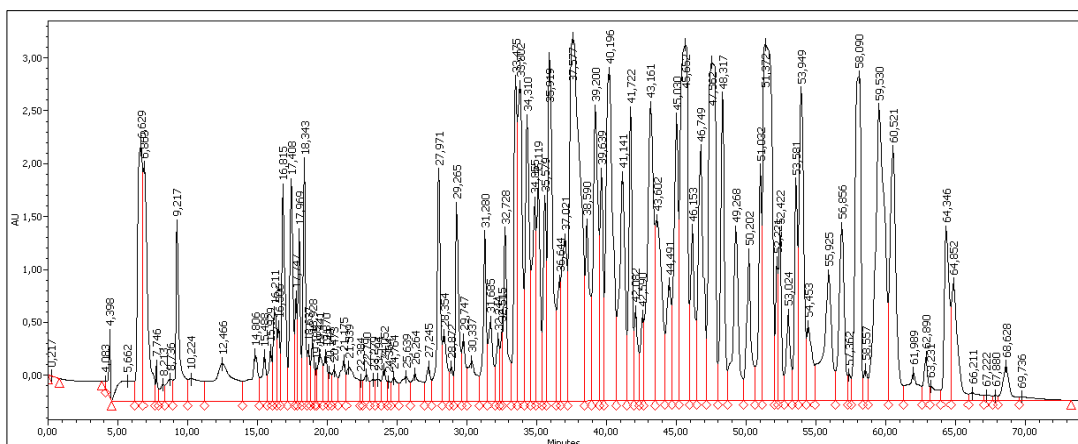
1. Se autoriza la investigación en la provincia de Esmeraldas, sitios de: San Lorenzo, San Mateo, la Unión, La Concordia.
2. Esta investigación **(SI)** faculta la colección de especímenes vivos
3. Esta autorización se otorga bajo los términos expresados en la propuesta de investigación, en tal sentido **(NO)** habilita para el manejo de fauna.
4. Esta autorización de investigación científica deberá ser renovada anualmente previa entrega y aprobación de los informes parciales.
5. En caso de prórroga, se la deberá solicitar con 15 días de anticipación a la fecha de vencimiento indicada en este documento.
6. Estos especímenes no podrán ser utilizados para actividades de bioprospección ni acceso a recursos genéticos.
7. El registro de los especímenes deberá ser entregado obligatoriamente en formato digital.
8. El incumplimiento de cualquiera de estas condiciones así como el uso indebido de este documento, o el incumplimiento de las disposiciones legales, administrativas o técnicas establecidas, serán sancionados conforme a la Codificación a Ley Forestal y con la suspensión inmediata del presente permiso
9. La tasa por concepto de emisión de patente es de USD\$ 20 (veinte dólares) (Libro IX Legislación Secundaria) y ha sido depositada en la cuenta del Banco Nacional de Fomento No. 10000777 con comprobante No 0715577 de fecha 23 de febrero de 2007.


Dr. Mauricio Angulo Ayovi
DIRECTOR TÉCNICO DE ÁREA - JEFE DE
DISTRITO FORESTAL 1 DE ESMERALDAS MA
Cc. Archivo

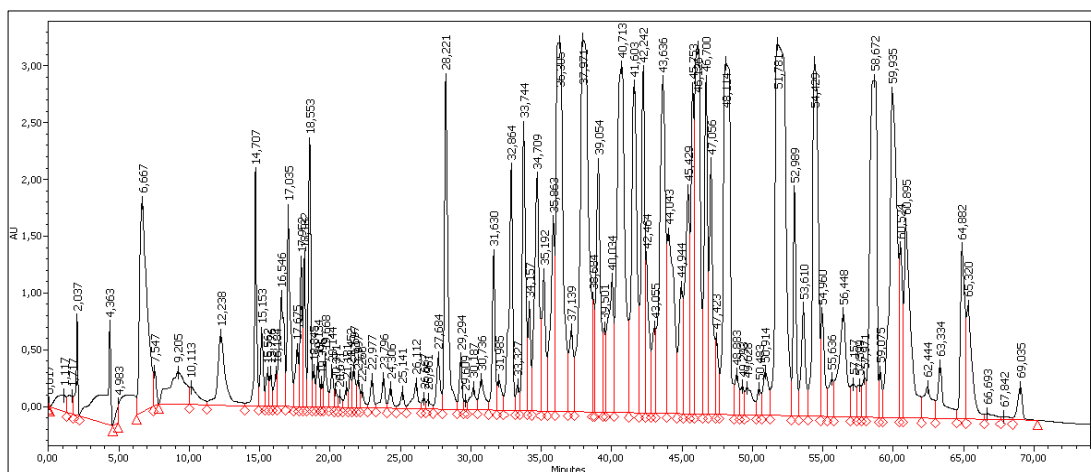
ANEXO 4. Cromatogramas obtenidos por HPLC de secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* en solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,12% (V/V) para la obtención de fracciones.



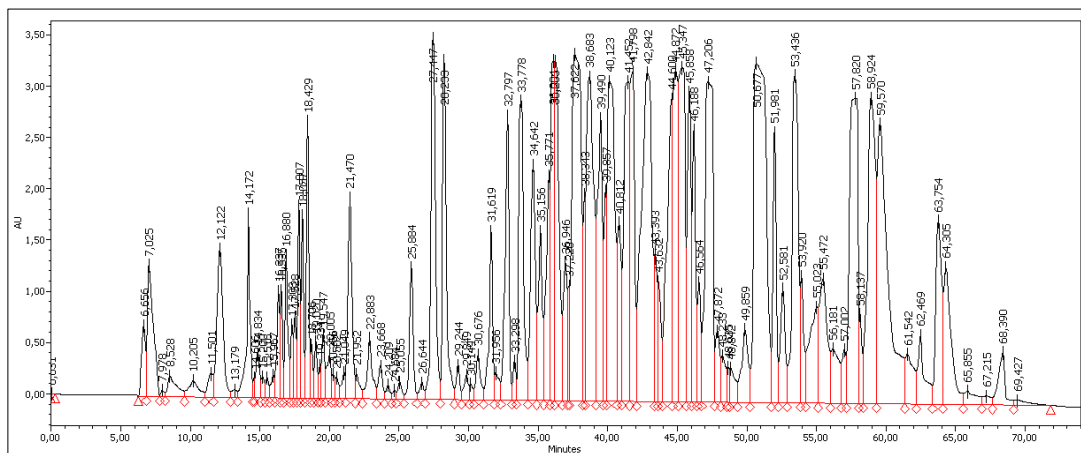
4.1. Cromatograma No.1



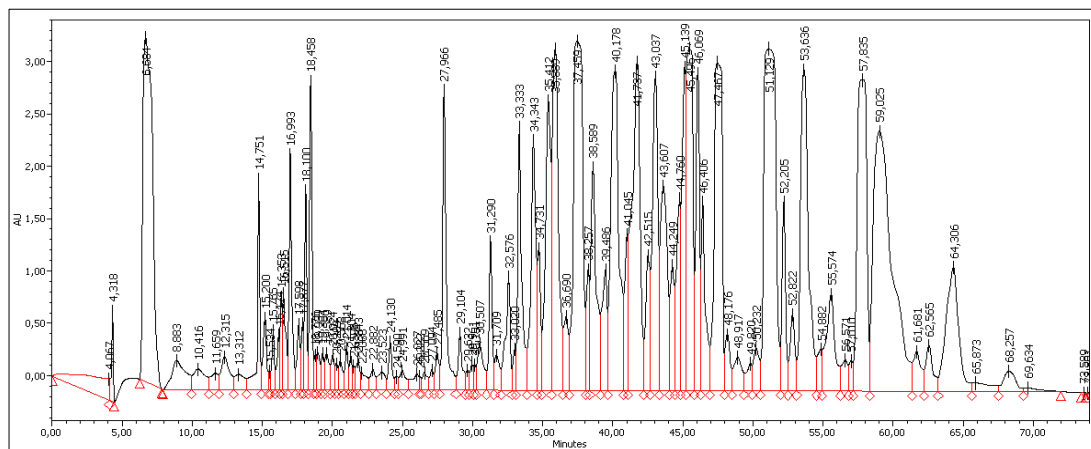
4.2. Cromatograma No.2



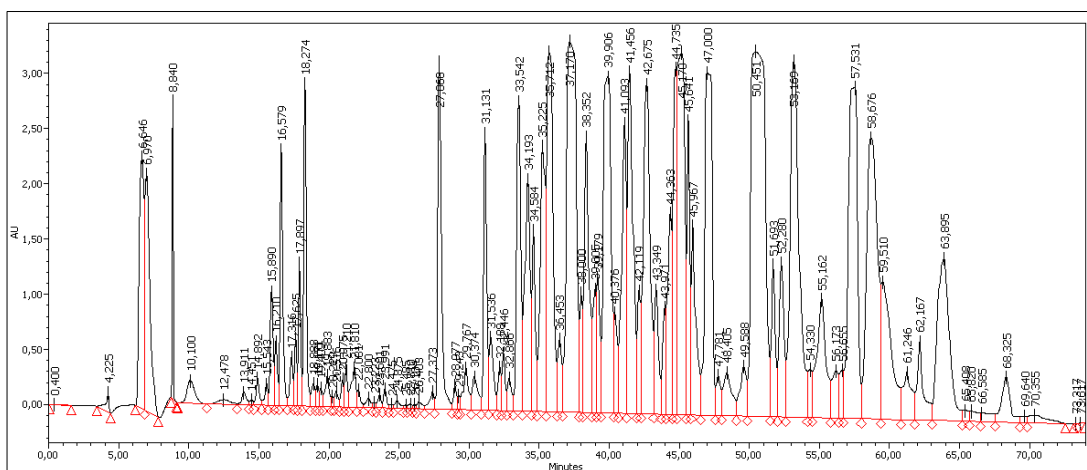
4.3. Cromatograma No.3



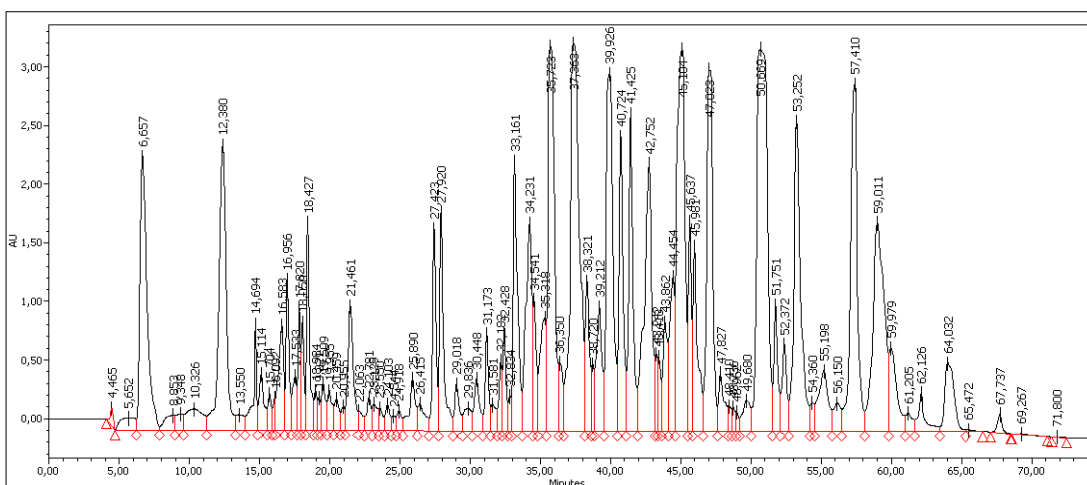
4.4. Cromatograma No.4



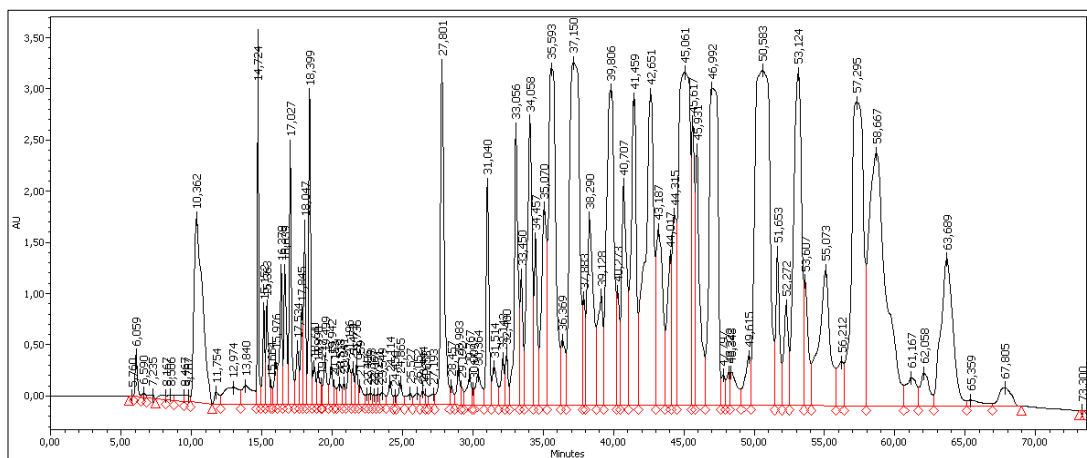
4.5. Cromatograma No.5



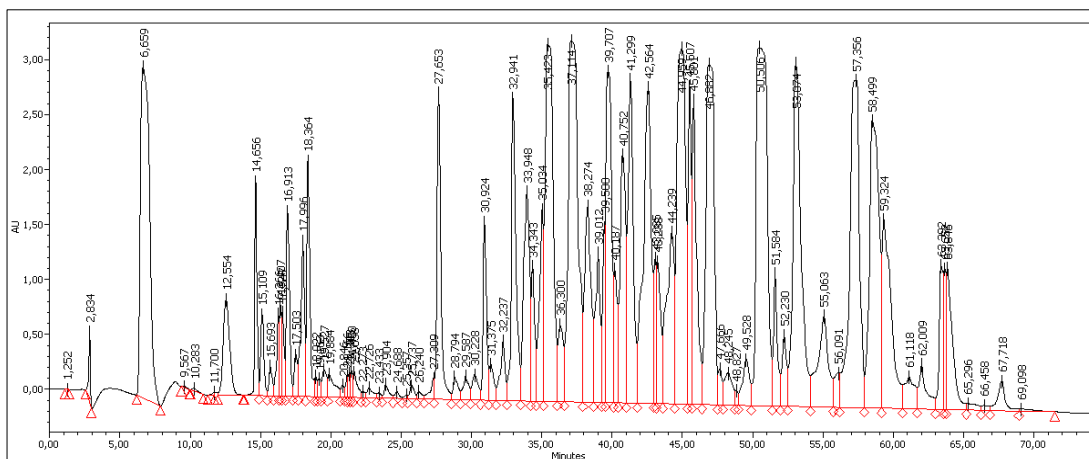
4.6. Cromatograma No.6



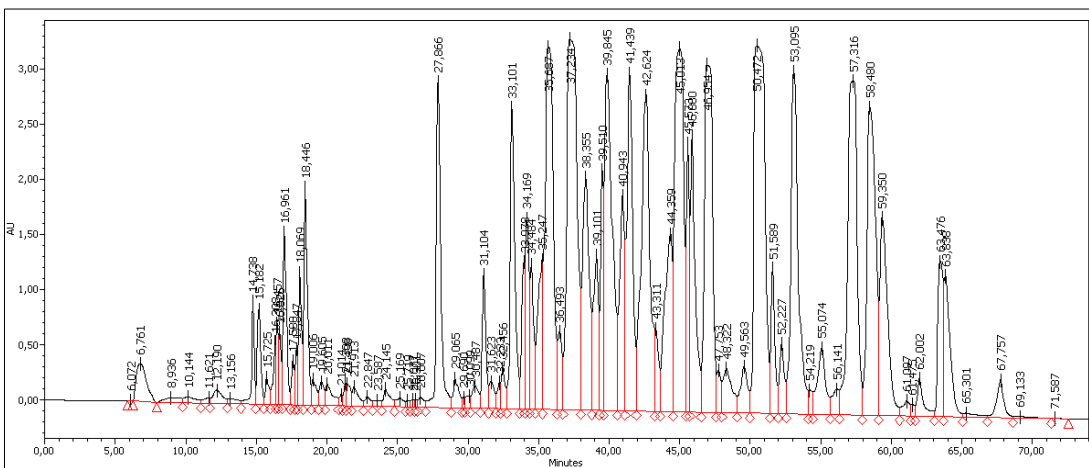
4.7. Cromatograma No.7



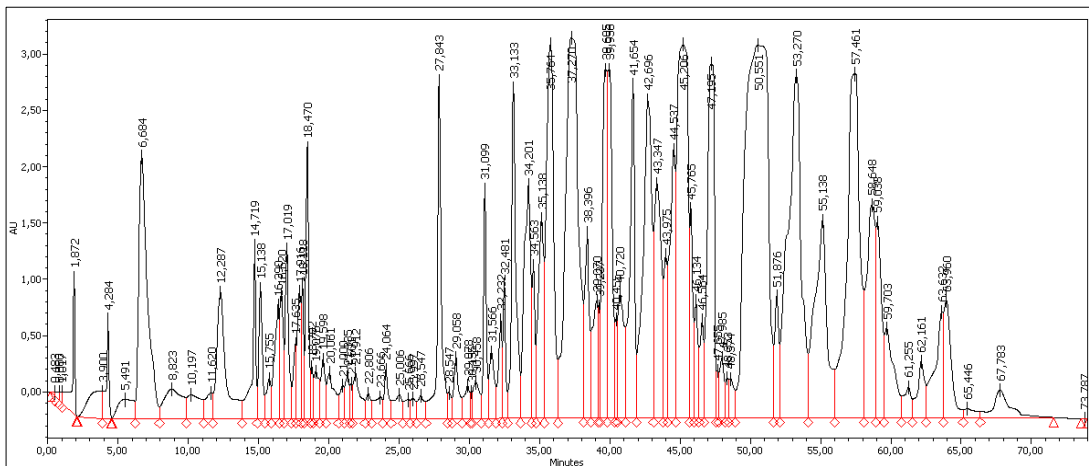
4.8. Cromatograma No.8



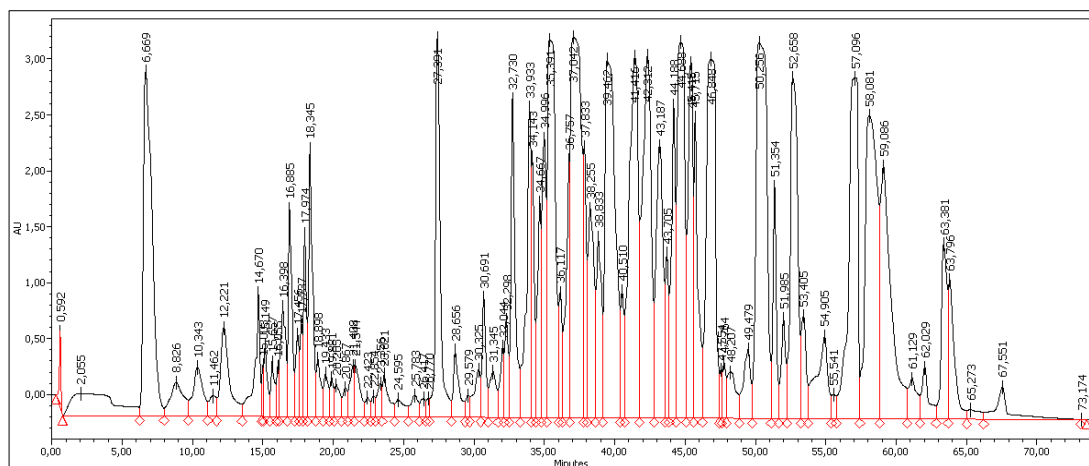
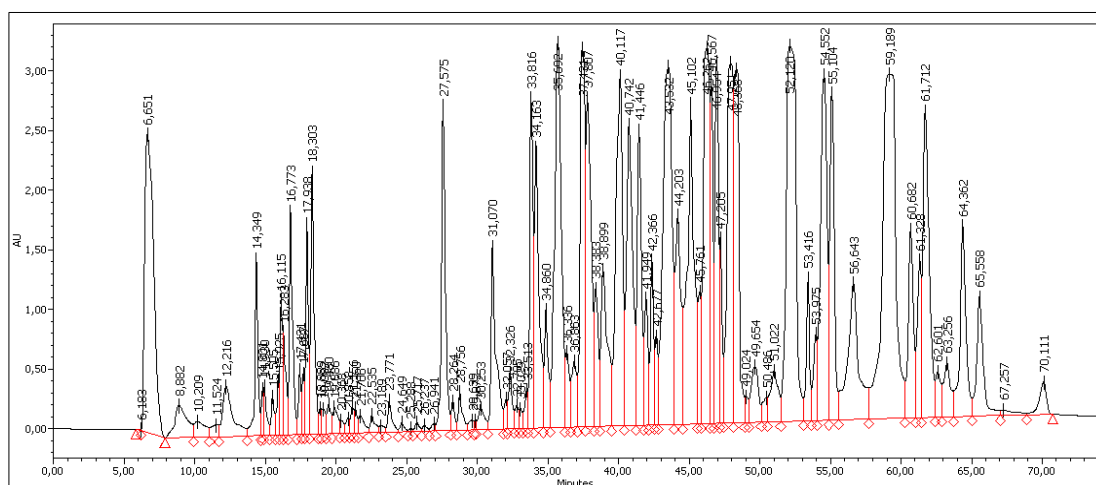
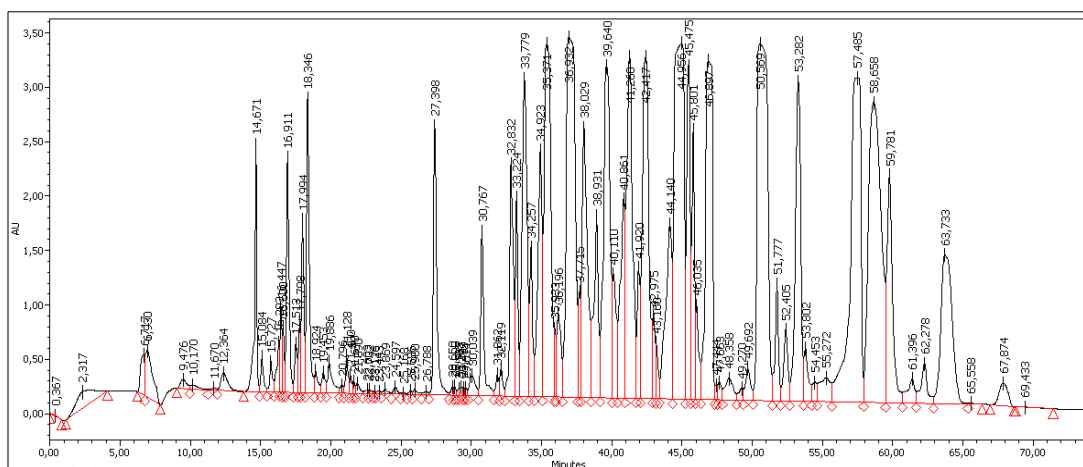
4.9. Cromatograma No.9

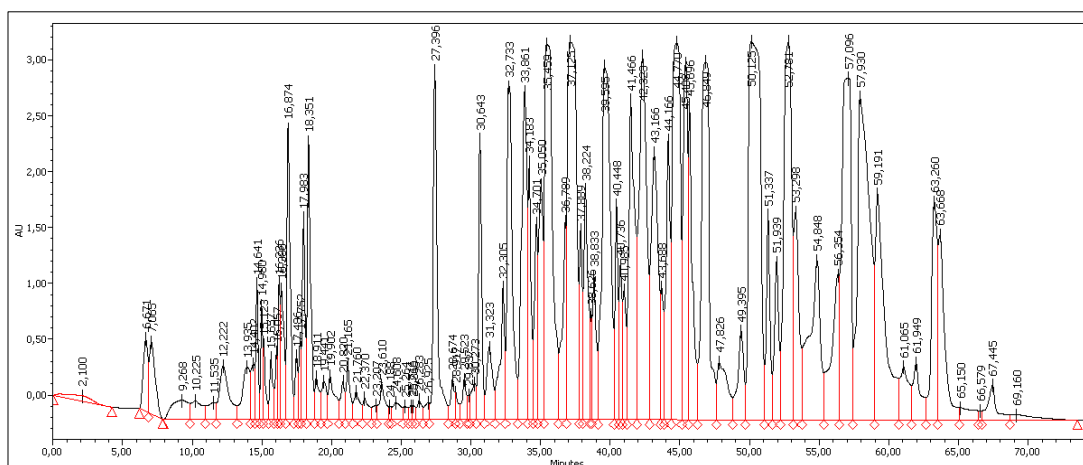


4.10. Cromatograma No.10

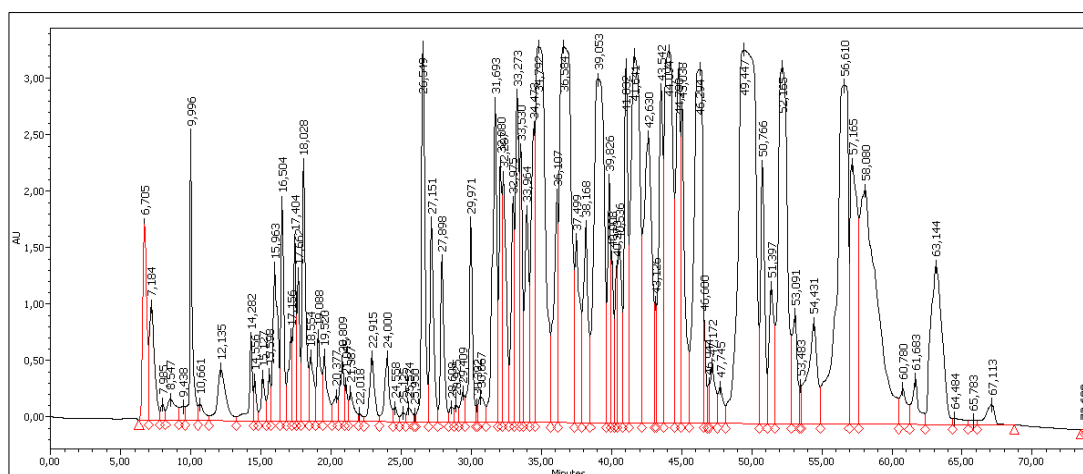


4.11. Cromatograma No.11

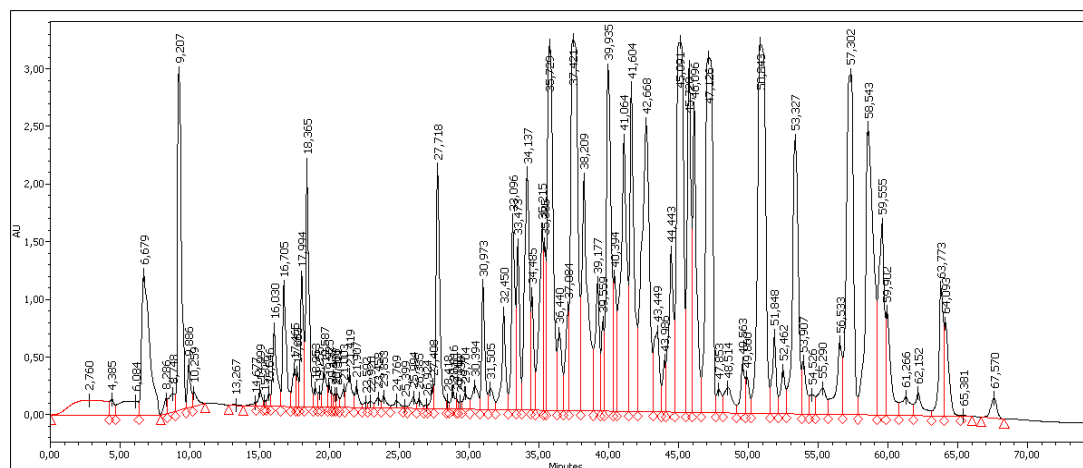




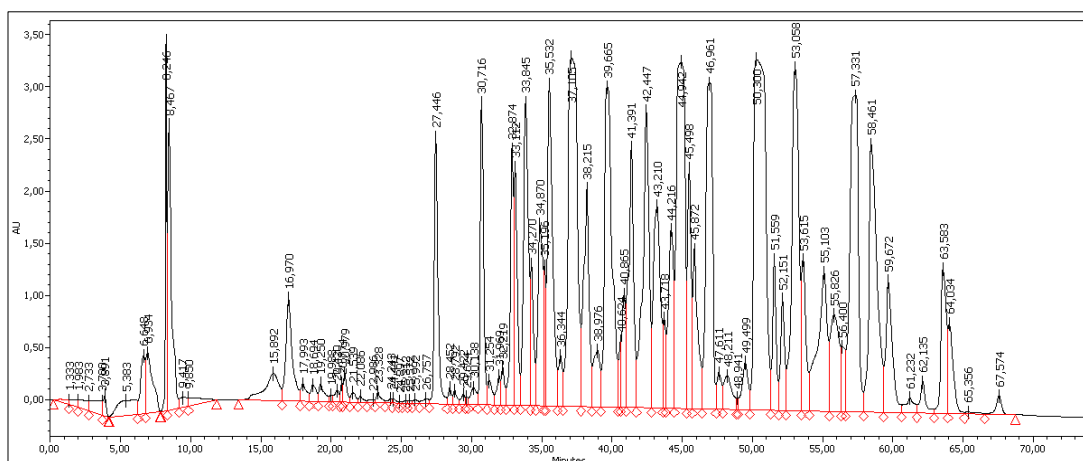
4.15. Cromatograma No.15



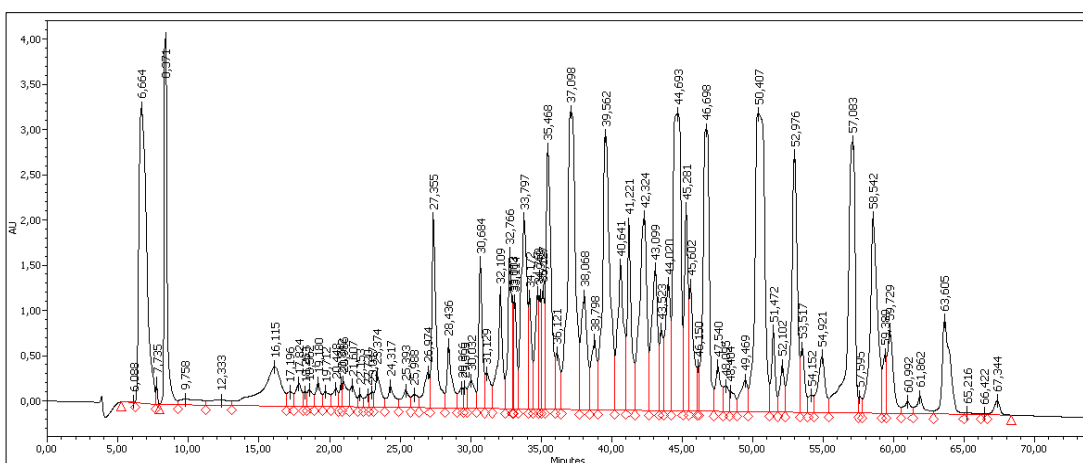
4.16. Cromatograma No.16



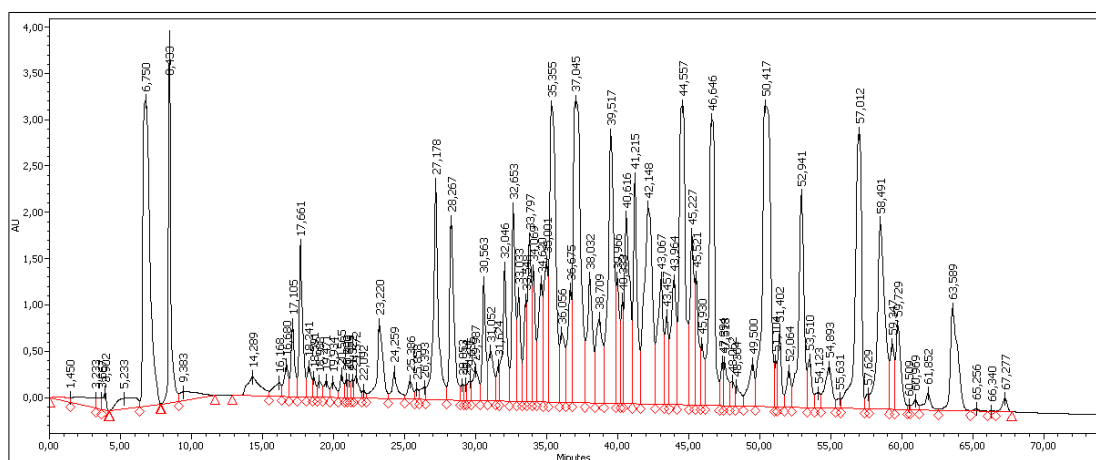
4.17. Cromatograma No.17



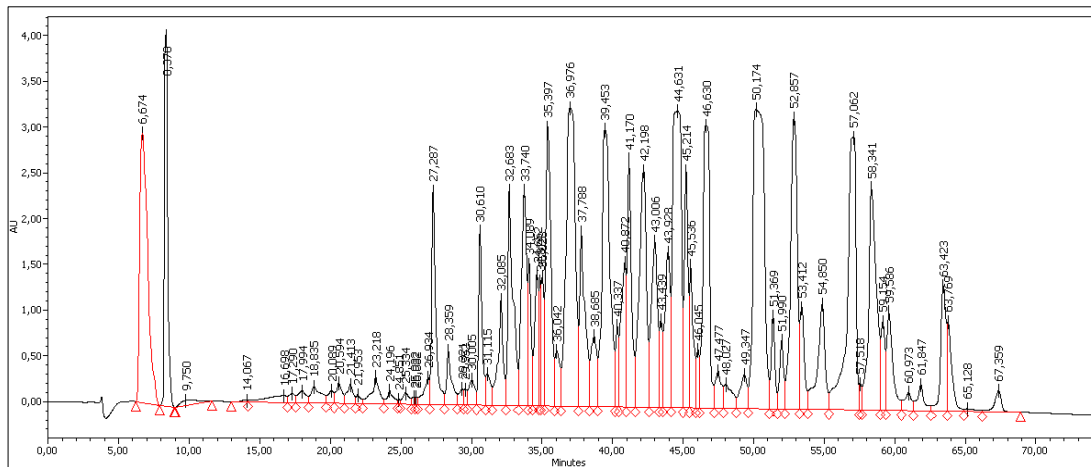
4.18. Cromatograma No.18



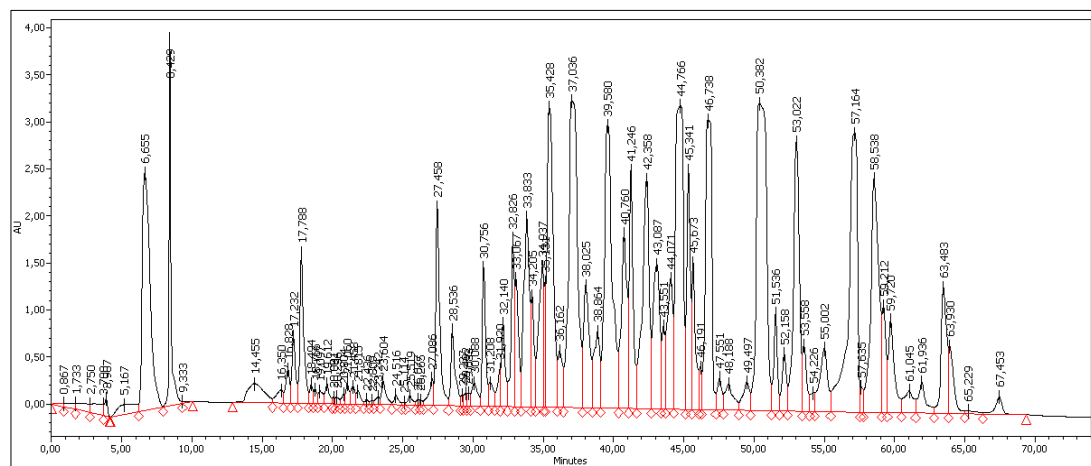
4.19. Cromatograma No.19



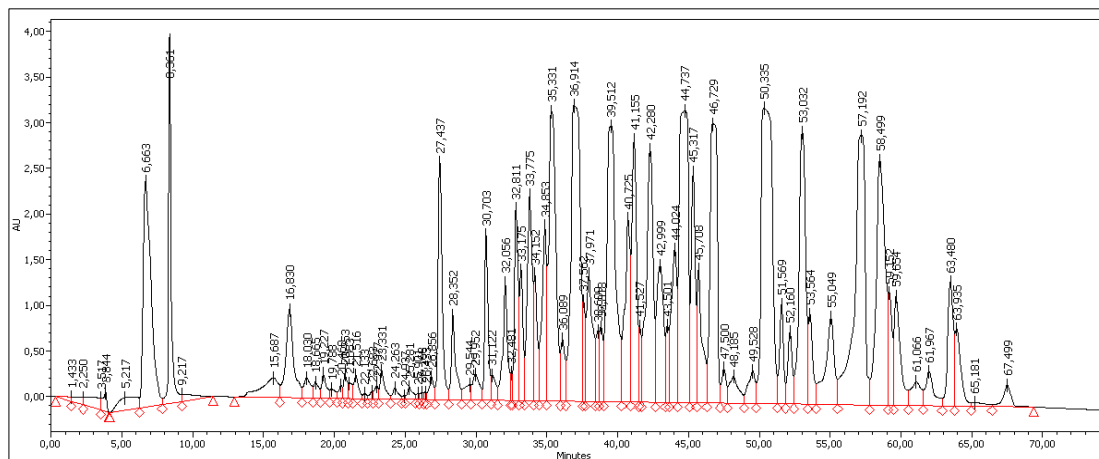
4.20. Cromatograma No.20



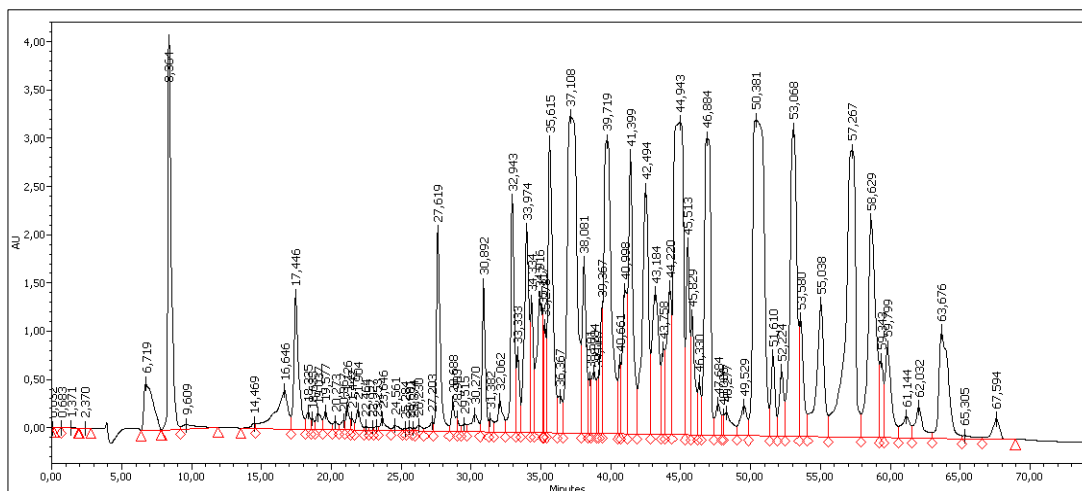
4.21. Cromatograma No.21



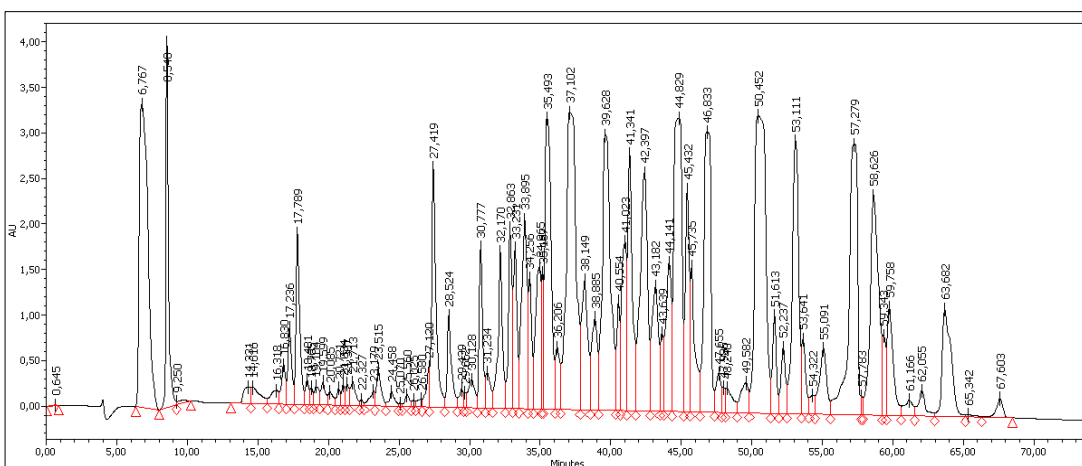
4.22. Cromatograma No.22



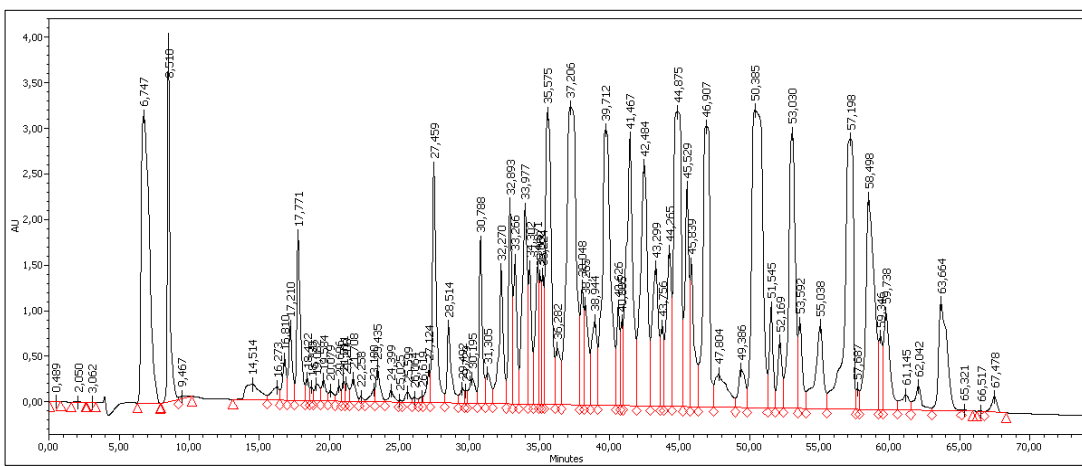
4.23. Cromatograma No.23



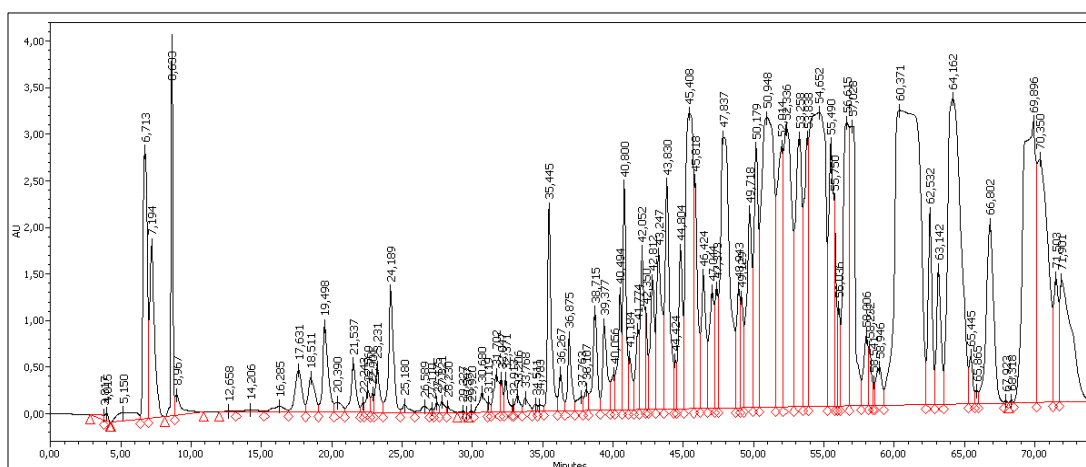
4.24. Cromatograma No.24



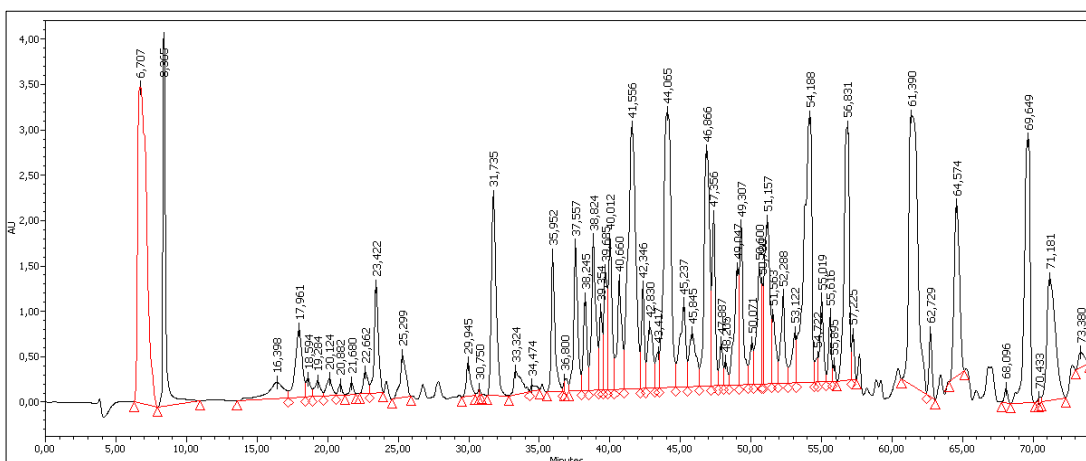
4.25. Cromatograma No.25



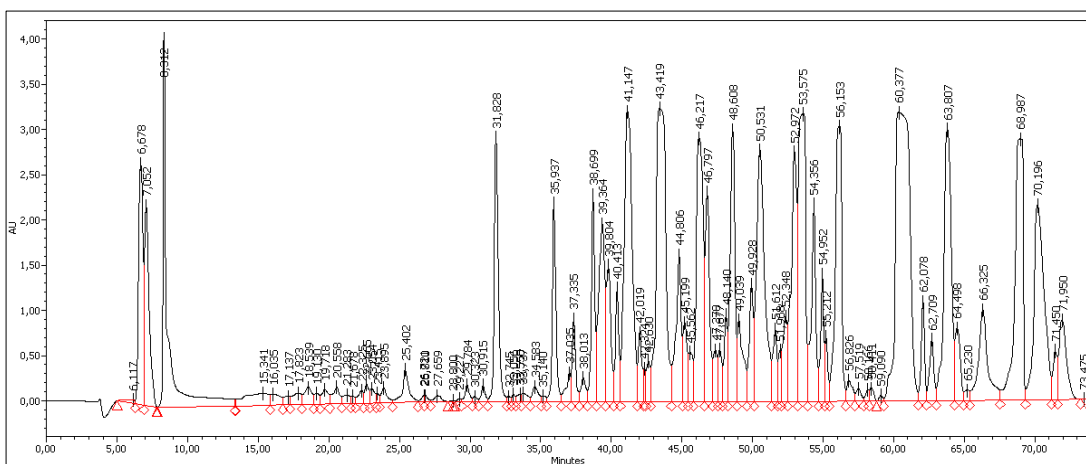
4.26. Cromatograma No.26



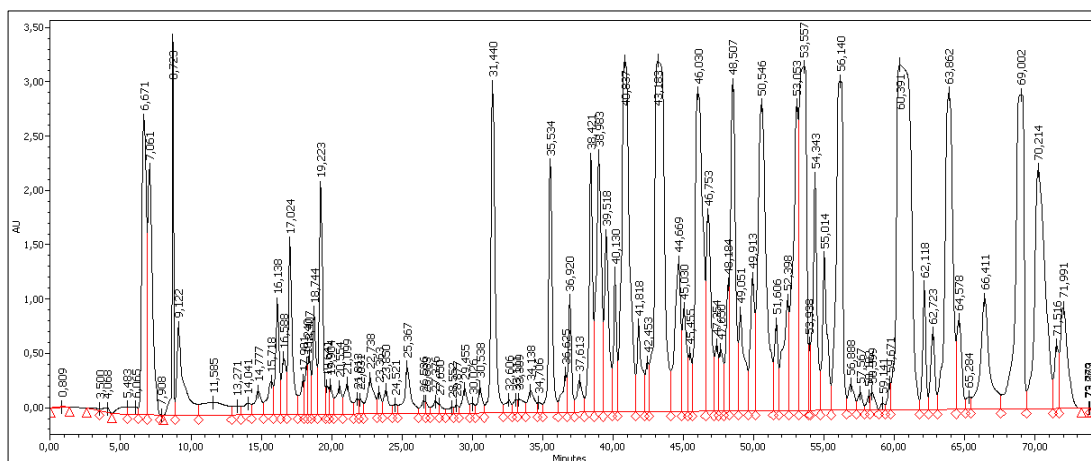
4.27. Cromatograma No.27



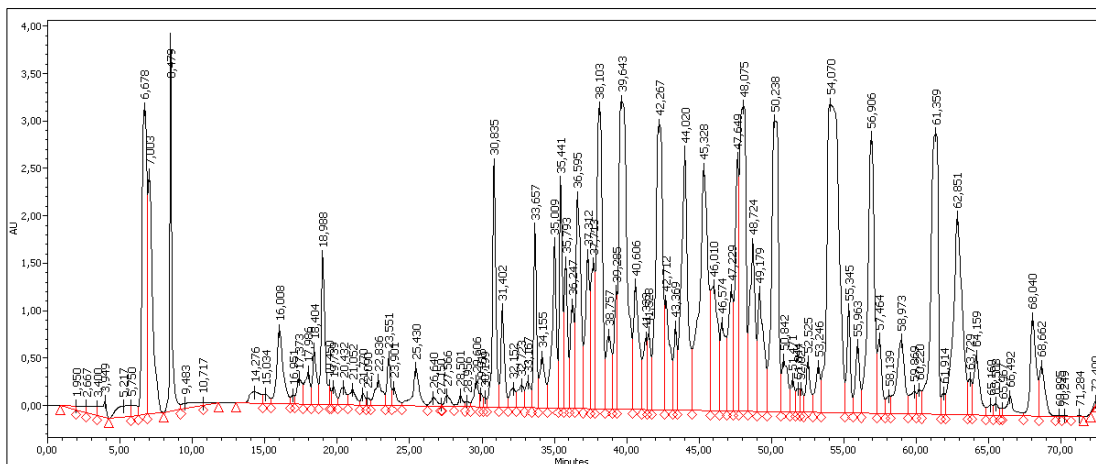
4.28. Cromatograma No.28



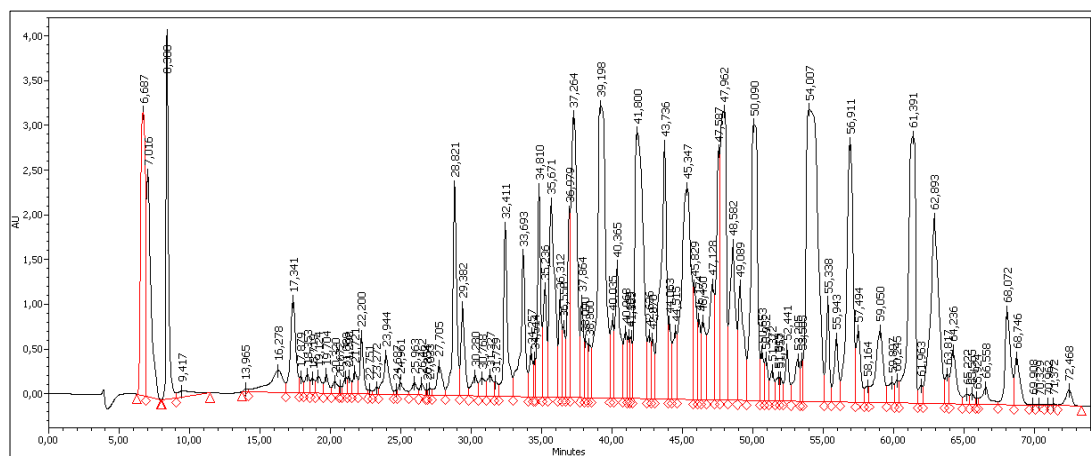
4.29. Cromatograma No.29



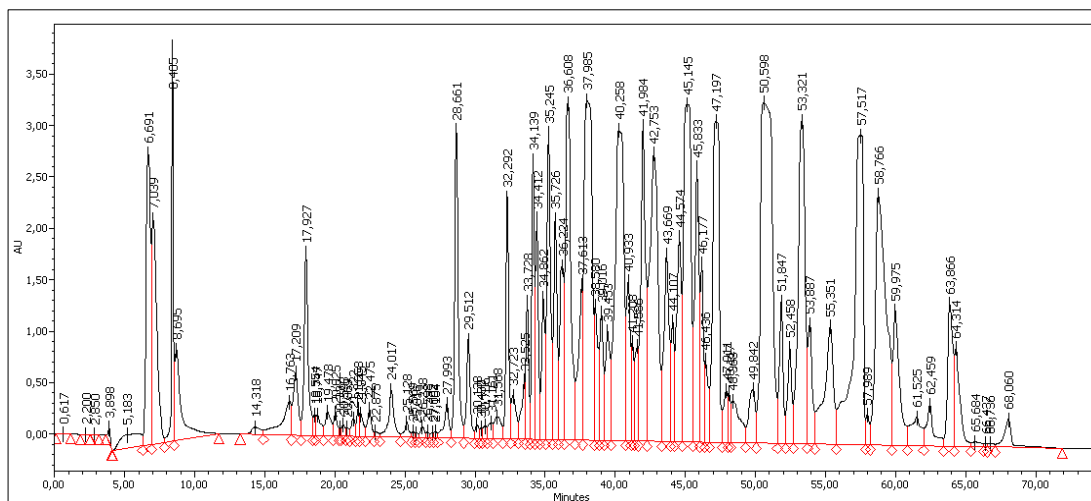
4.30. Cromatograma No.30

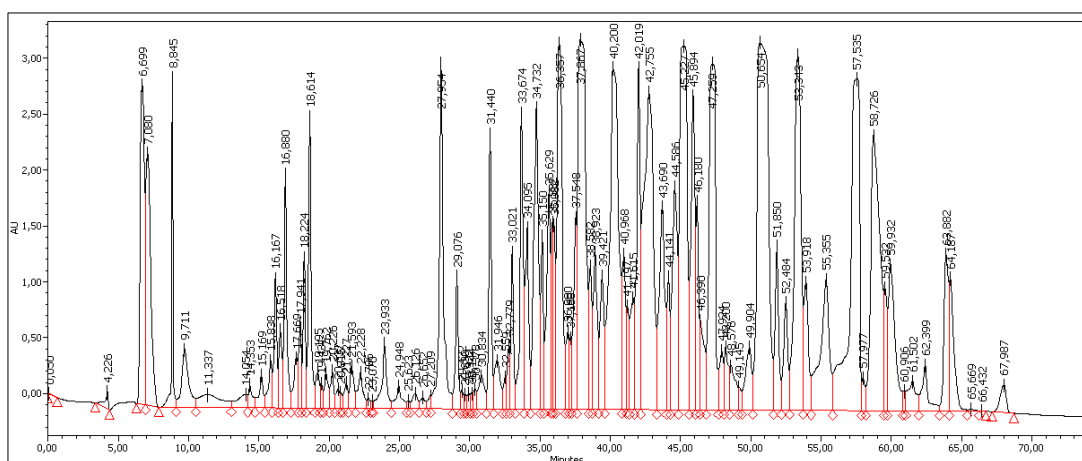


4.31. Cromatograma No.31

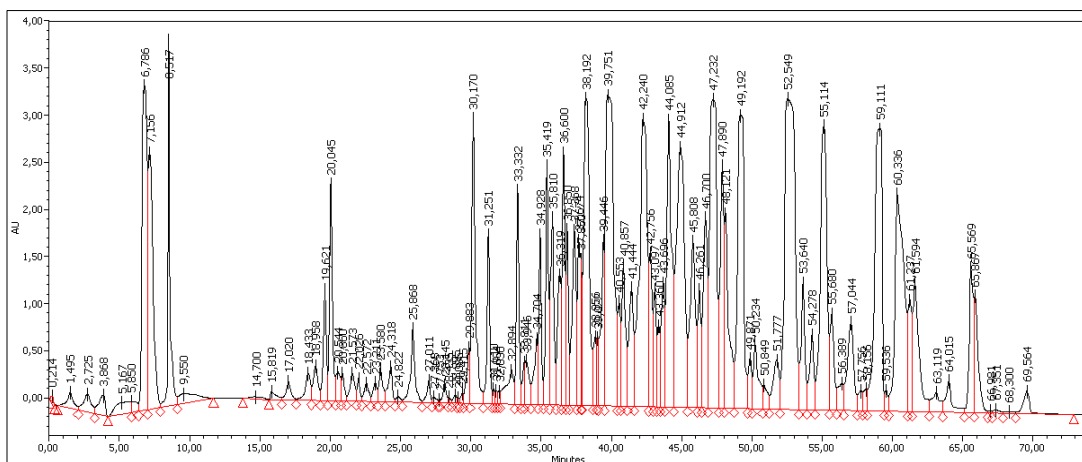


4.32. Cromatograma No.32

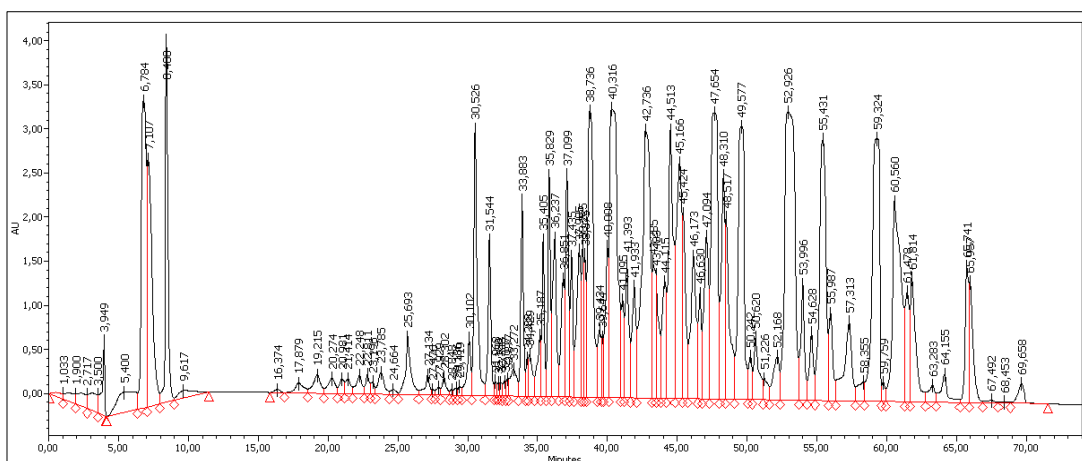




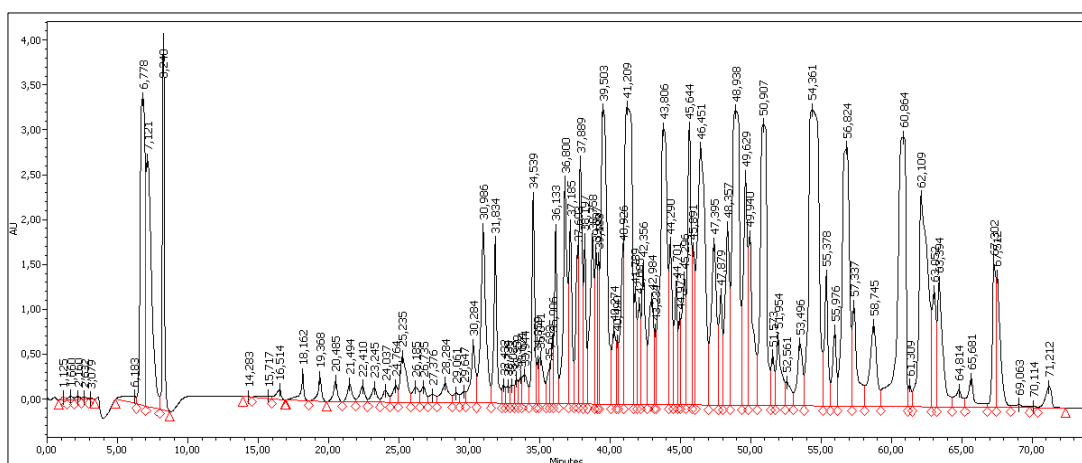
4.36. Cromatograma No.36



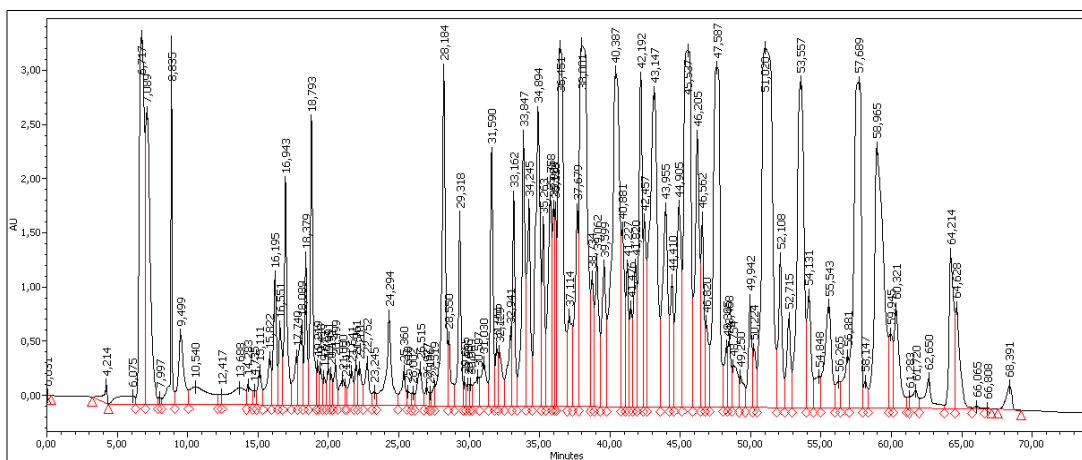
4.37. Cromatograma No.37



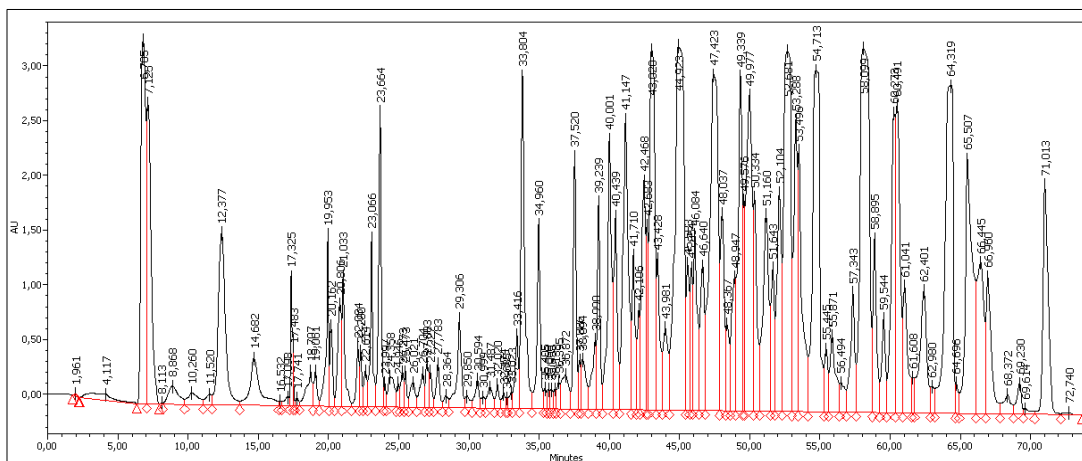
4.38. Cromatograma No.38



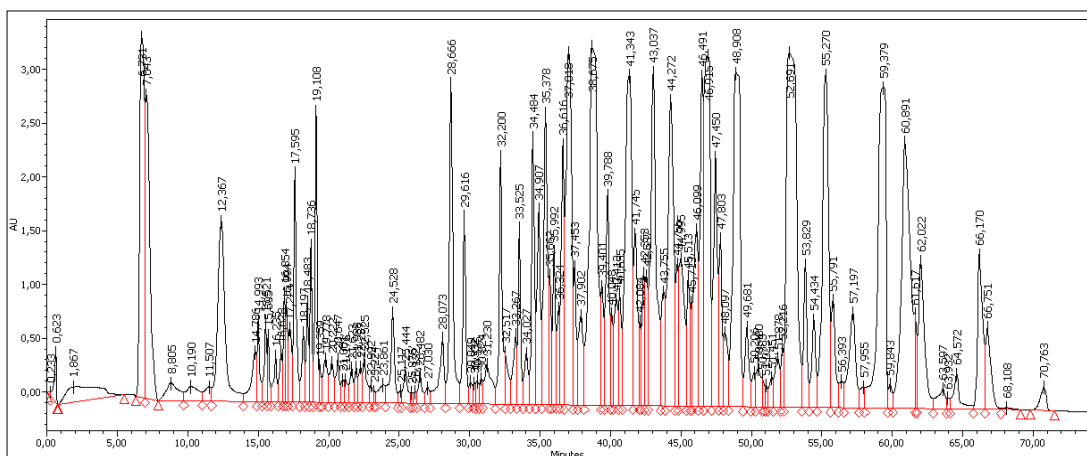
4.39. Cromatograma No.39



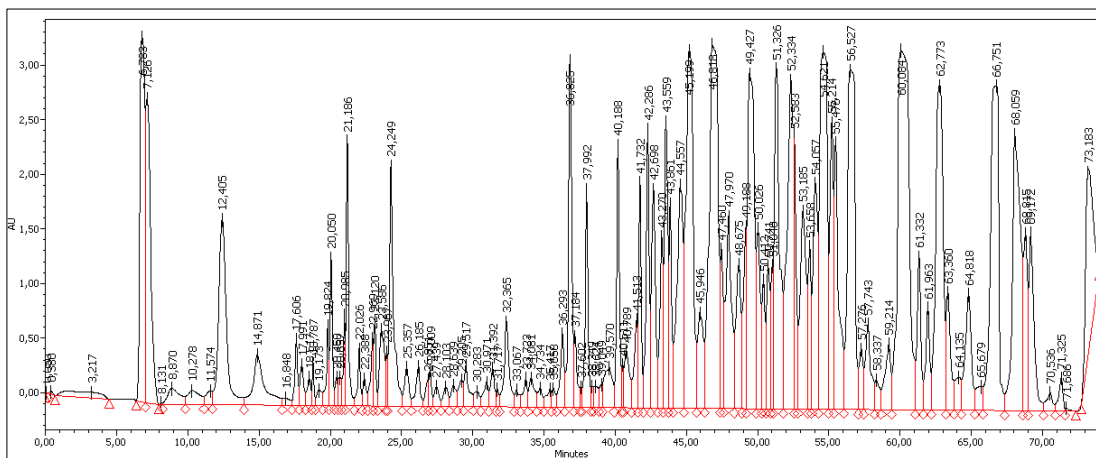
4.40. Cromatograma No.40

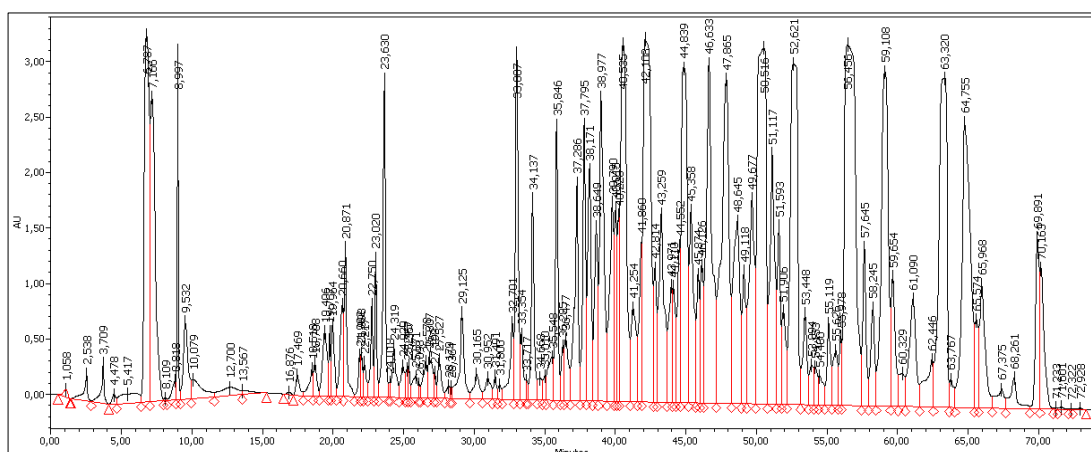


4.41. Cromatograma No.41

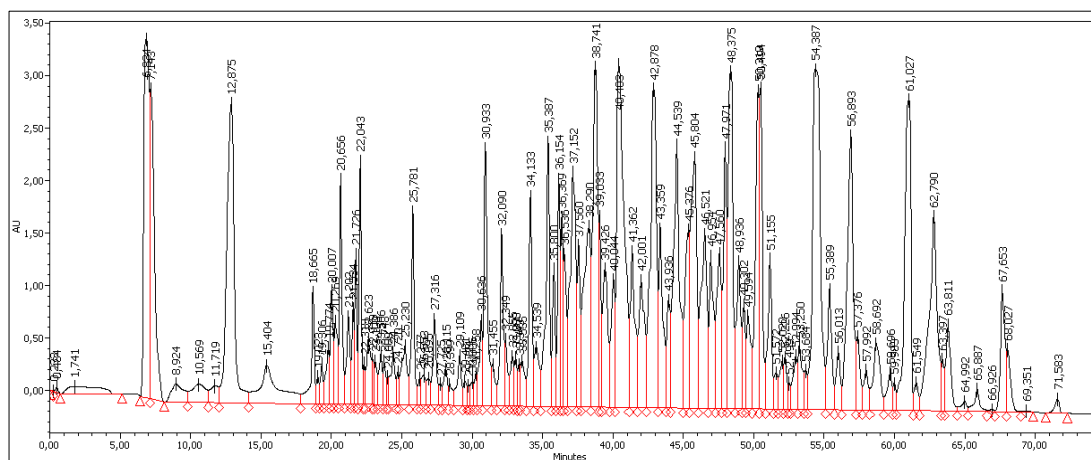


4.42. Cromatograma No.42

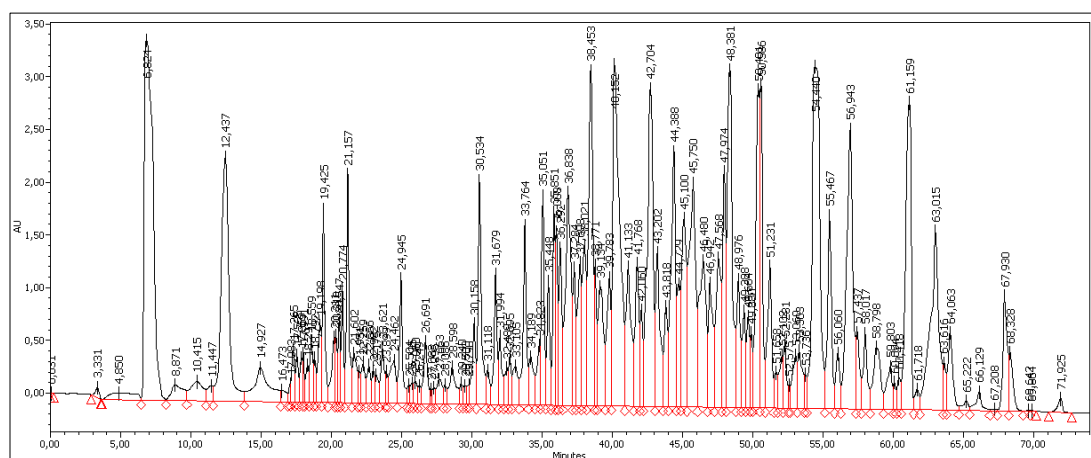




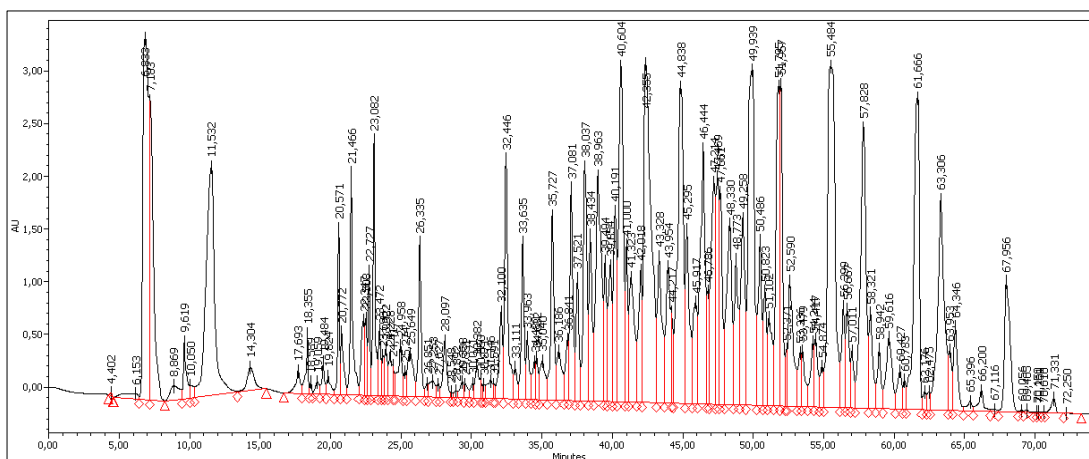
4.45. Cromatograma No.45



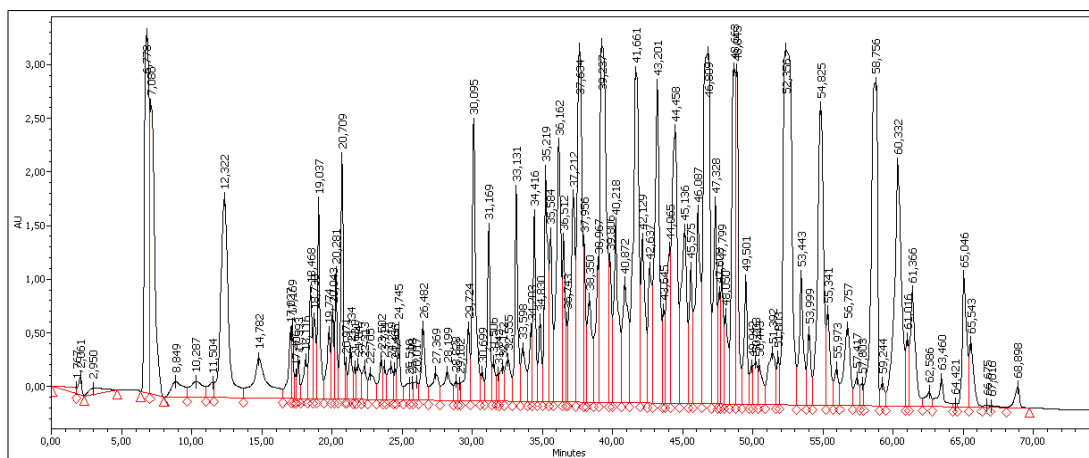
4.46. Cromatograma No.46



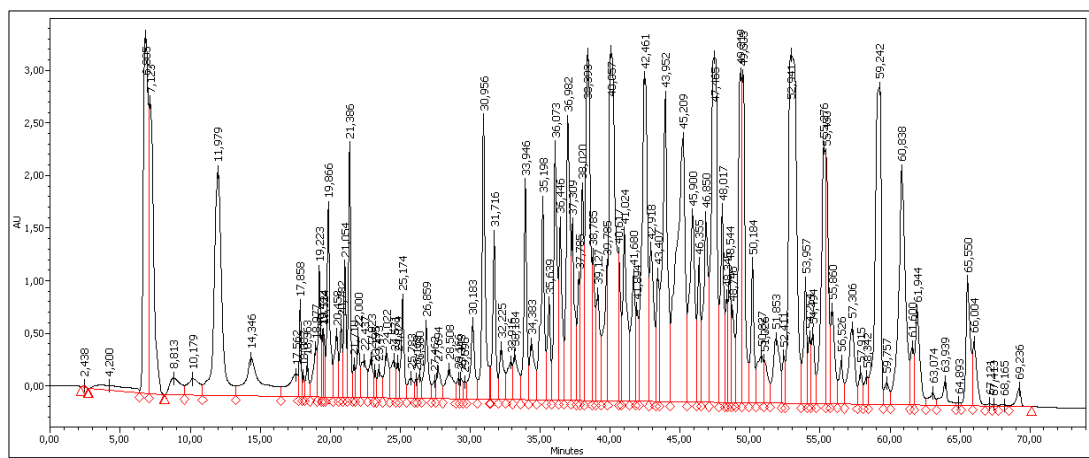
4.47. Cromatograma No.47



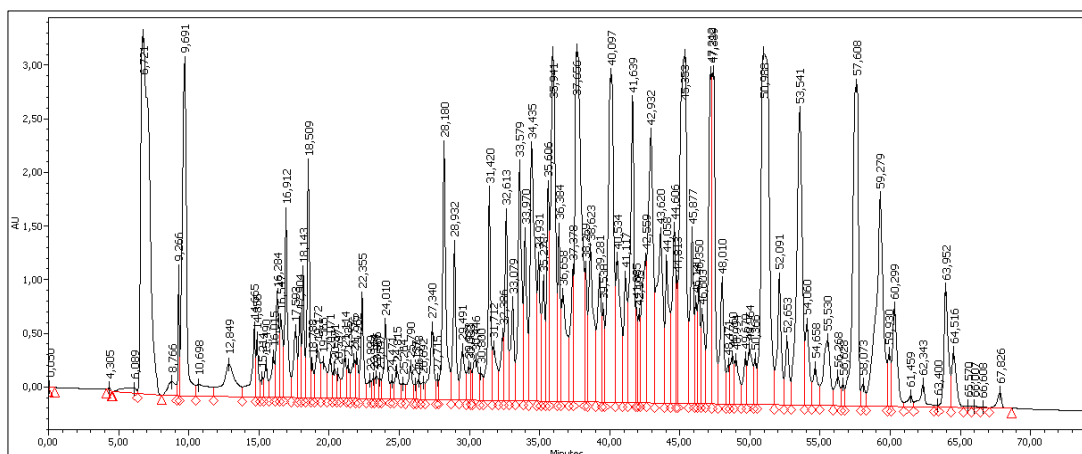
4.48. Cromatograma No.48



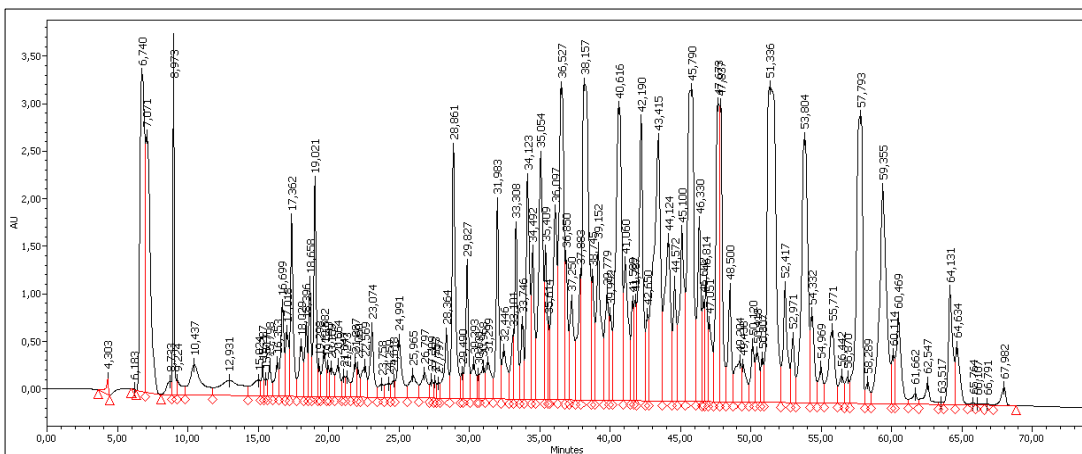
4.49. Cromatograma No.49



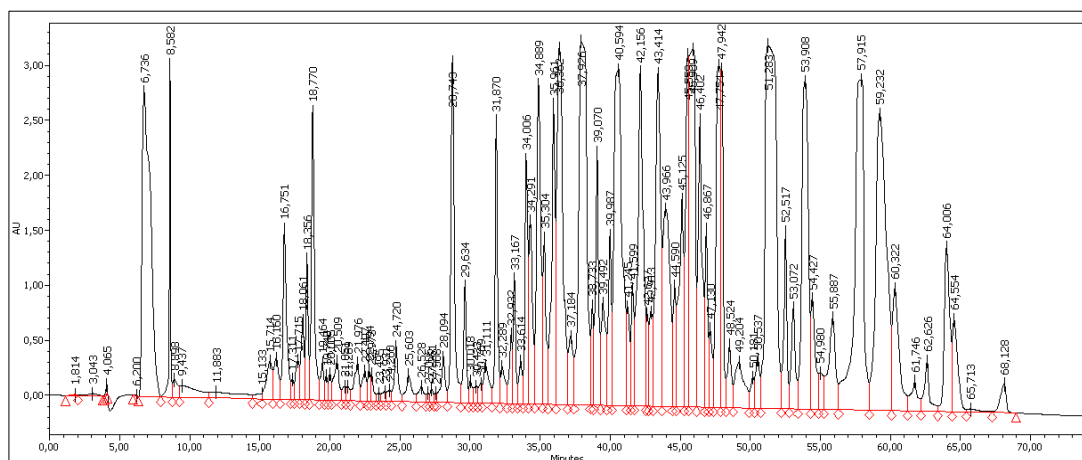
4.50. Cromatograma No.50



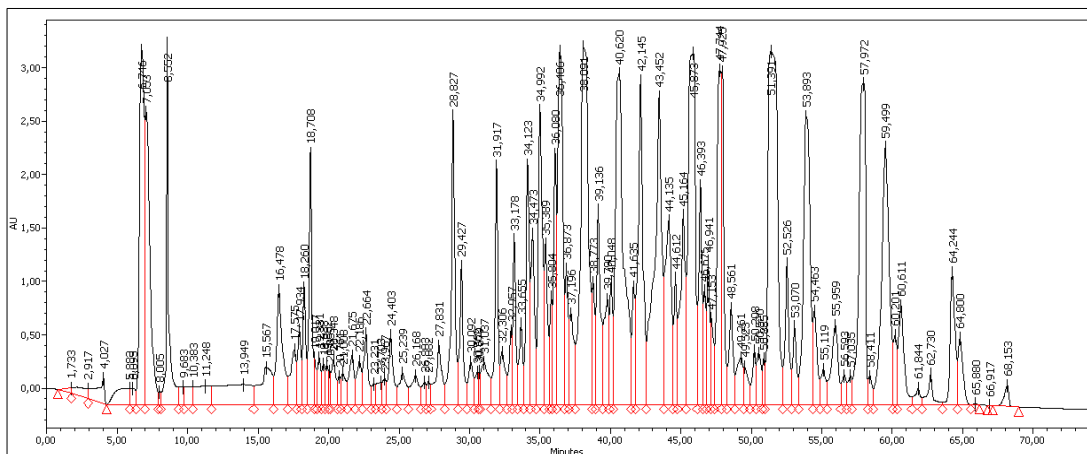
4.51. Cromatograma No.51



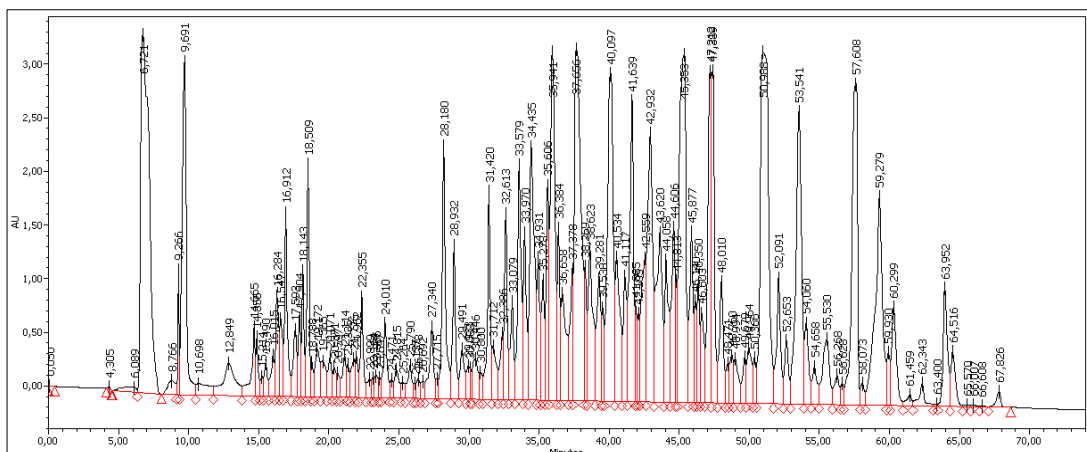
4.52. Cromatograma No.52



4.53. Cromatograma No.53

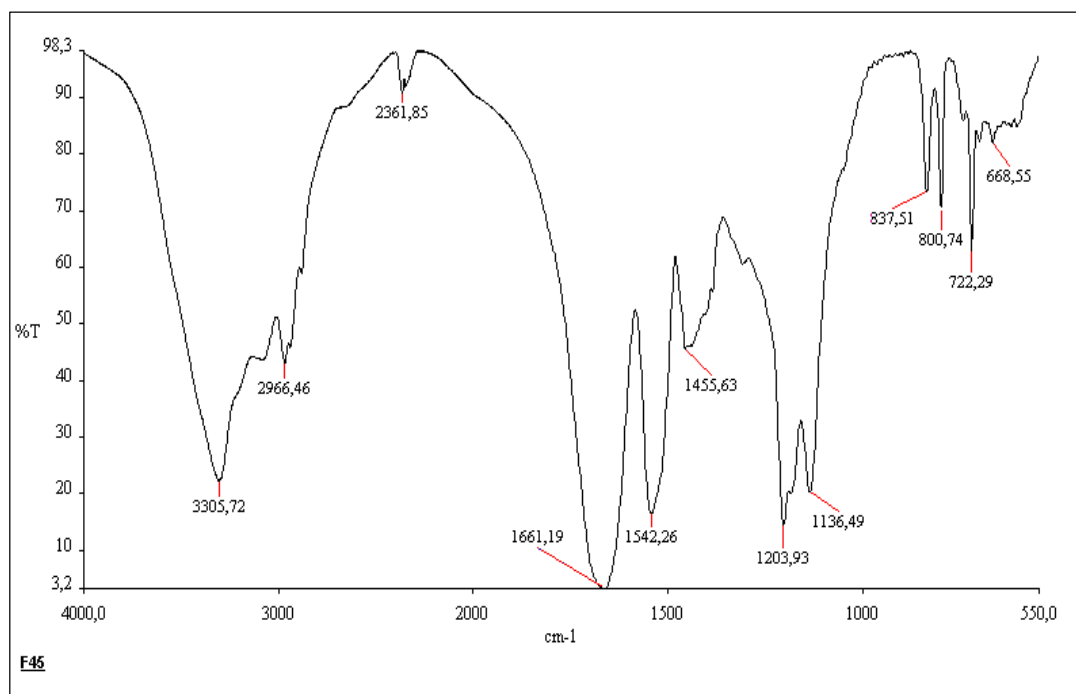


4.54. Cromatograma No.54

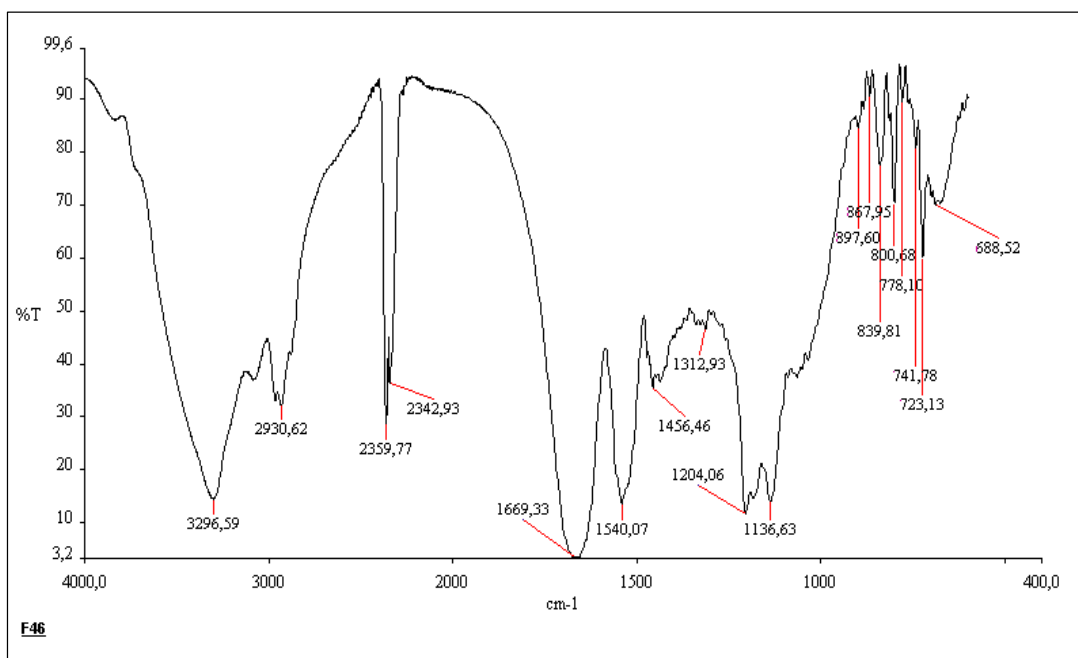


4.55. Cromatograma No.55

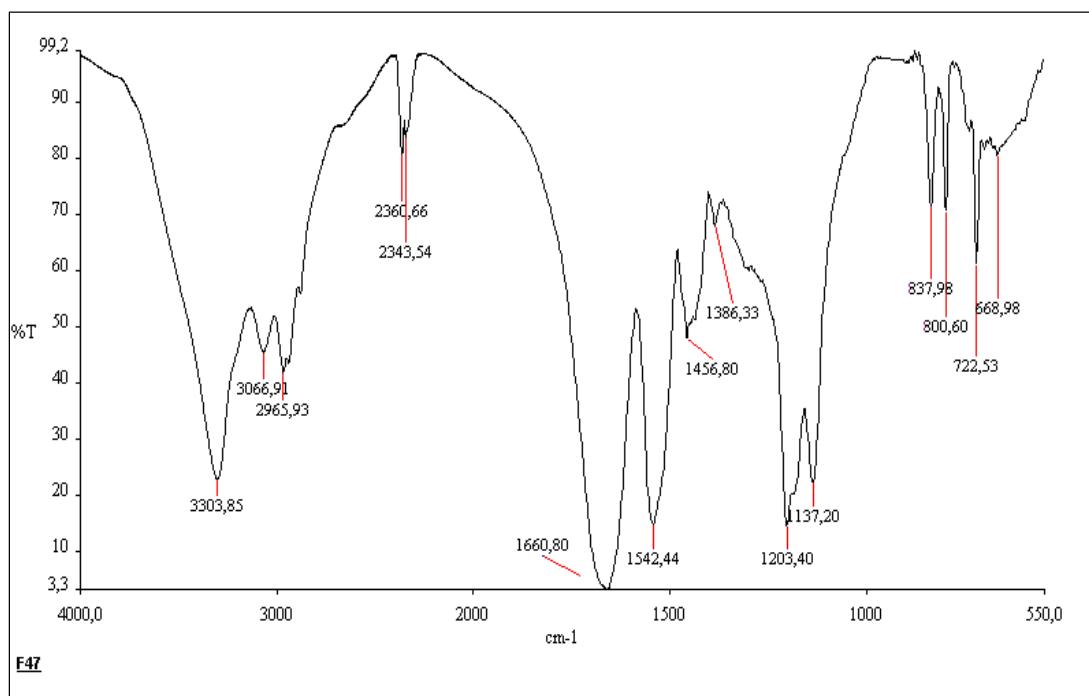
ANEXO 5. Espectros de fracciones con actividad antimicrobiana obtenidas por
Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FT-IR).



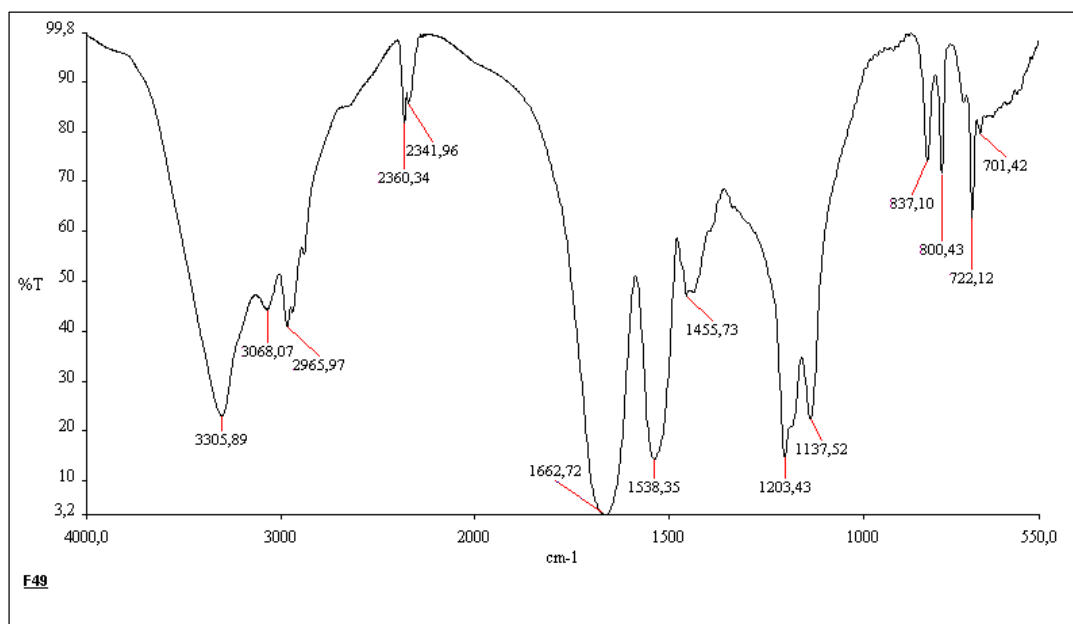
5.1. Espectro de la Fracción No.45, pastilla con Bromuro de Potasio grado
espectrométrico.



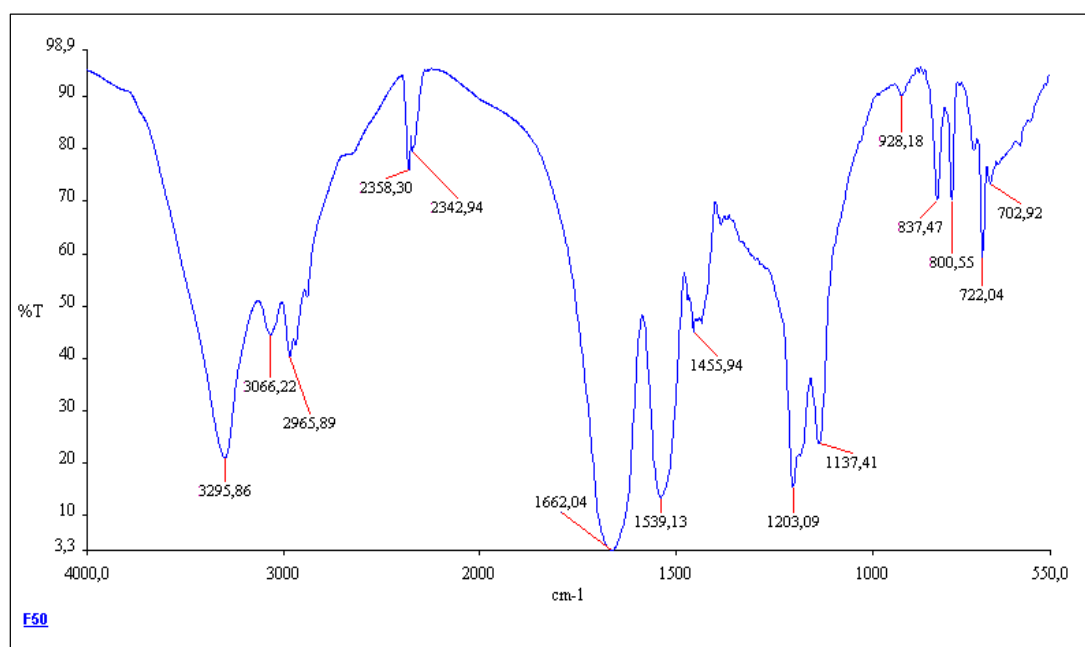
5.2. Espectro de la Fracción No.46, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



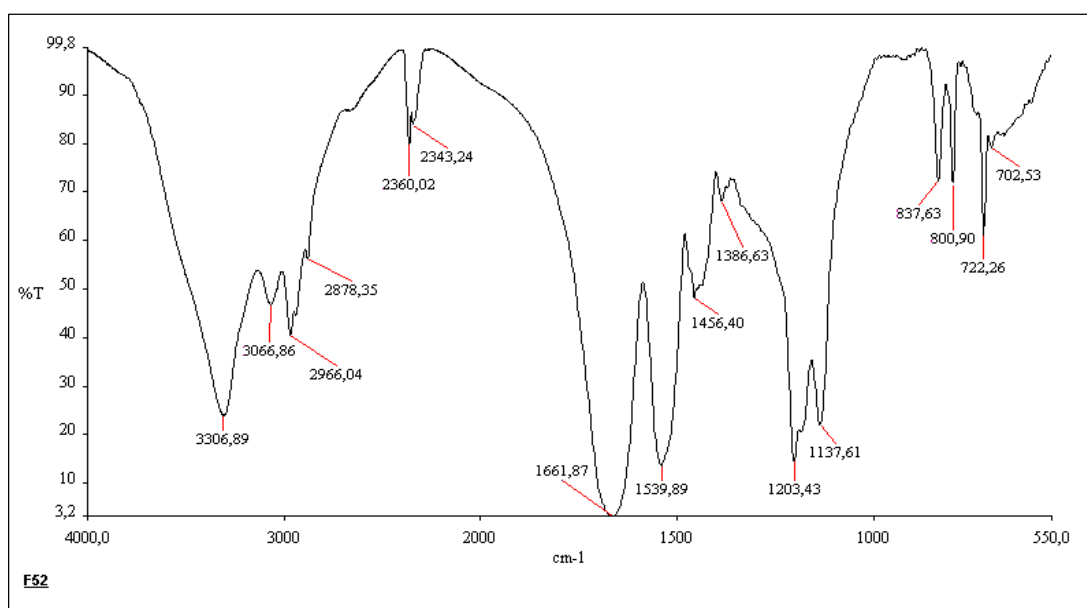
5.3. Espectro de la Fracción No.47, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



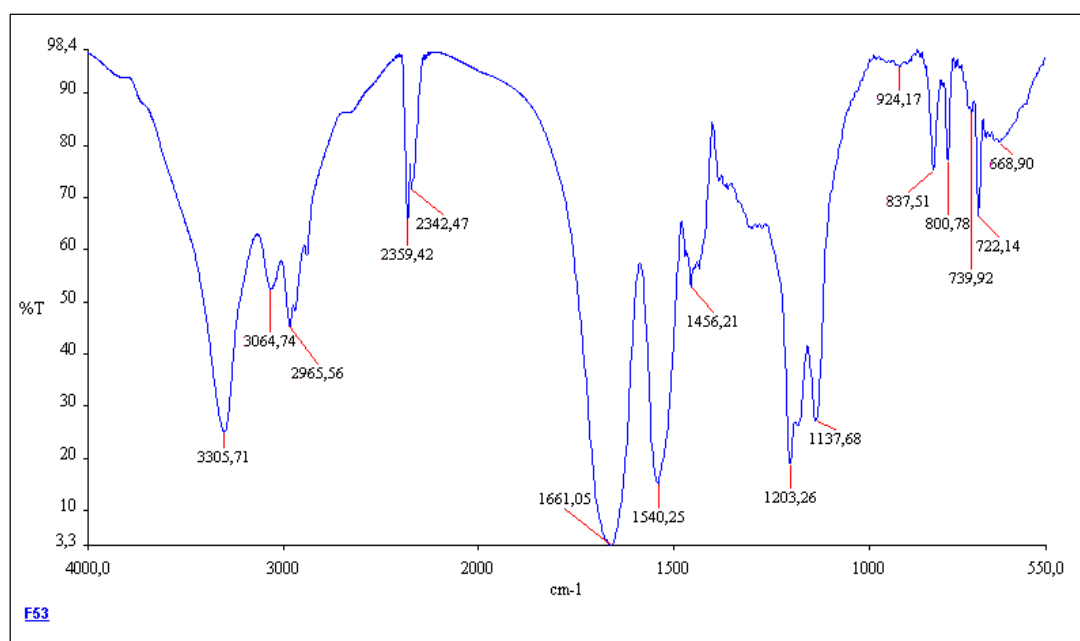
5.4. Espectro de la Fracción No.49, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



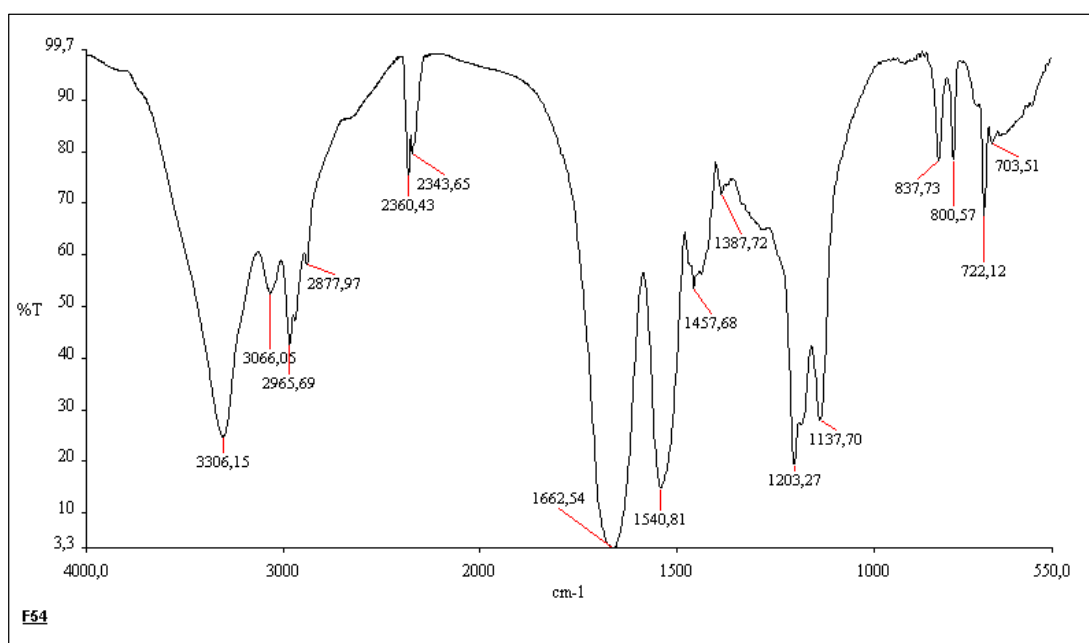
5.5. Espectro de la Fracción No.50, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



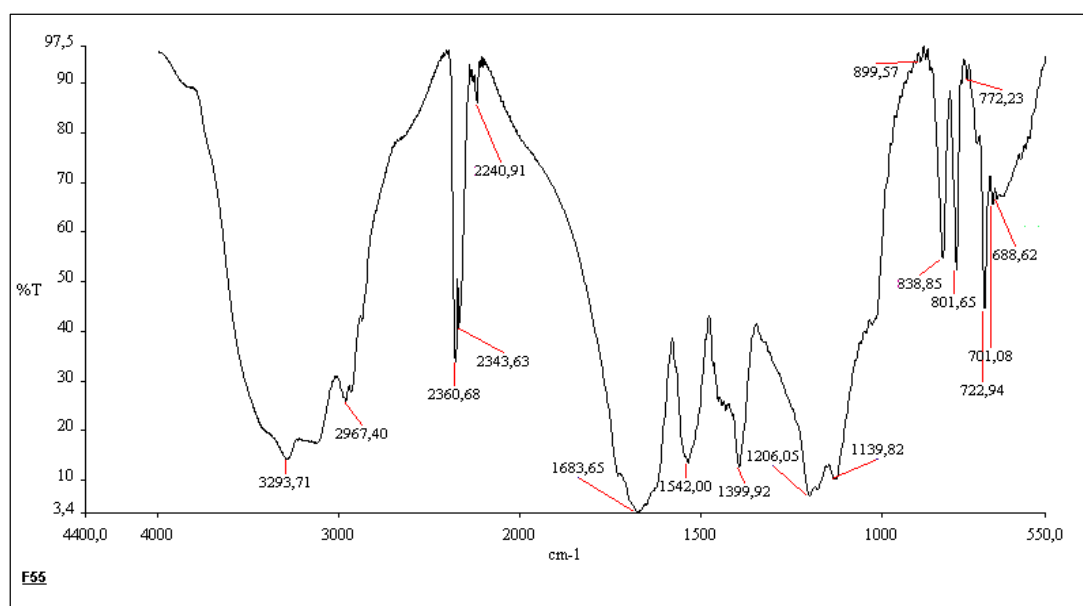
5.6. Espectro de la Fracción No.52, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



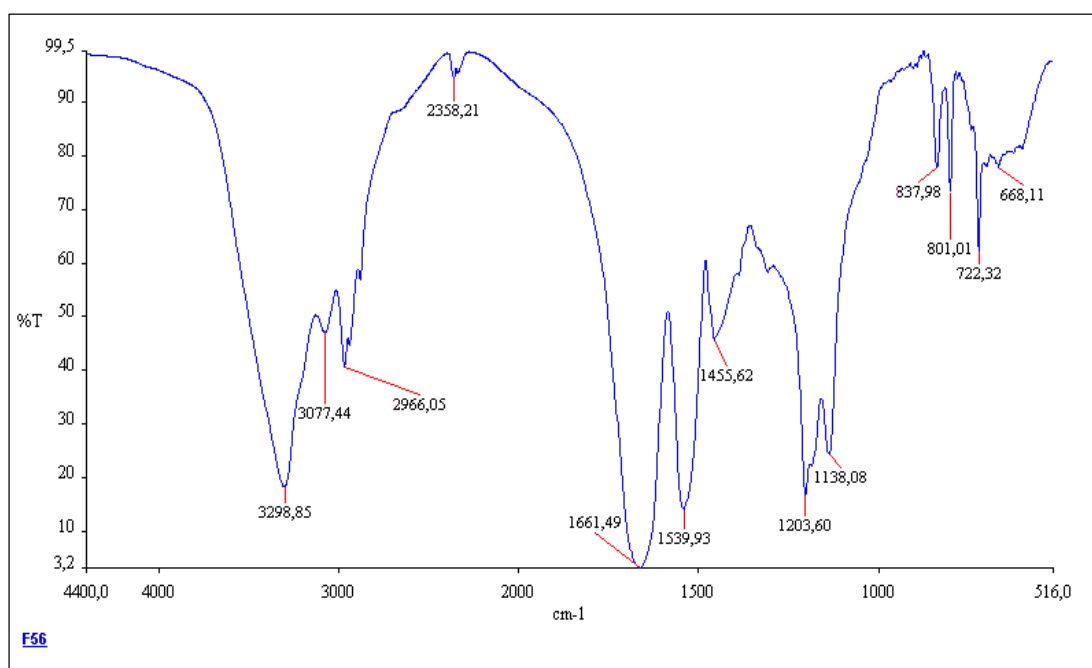
5.7. Espectro de la Fracción No.53, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



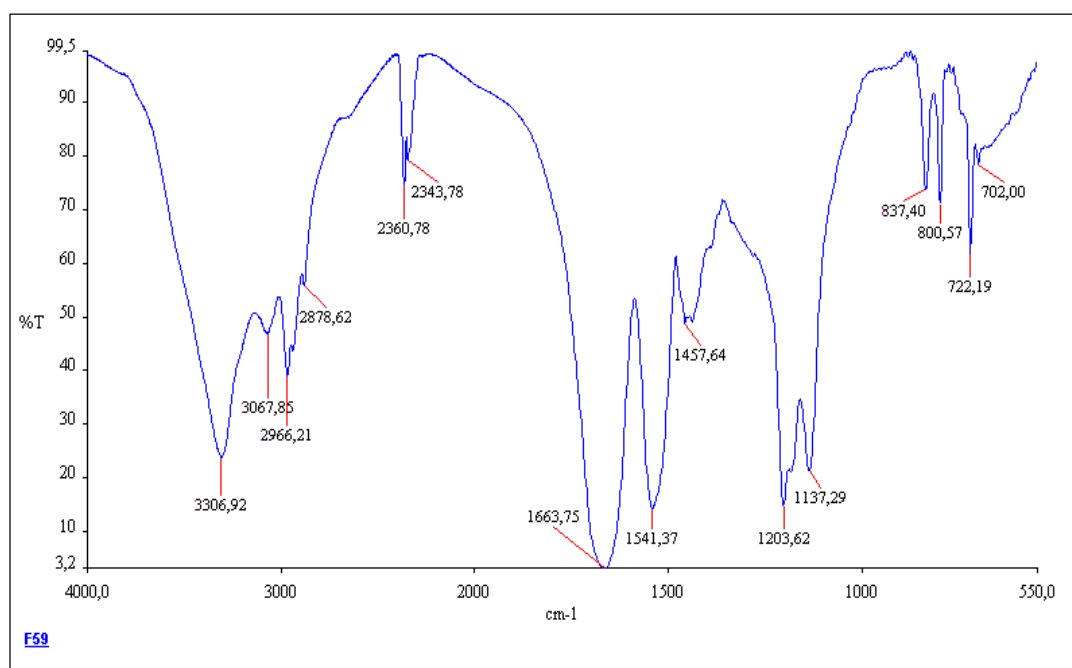
5.8. Espectro de la Fracción No.54, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



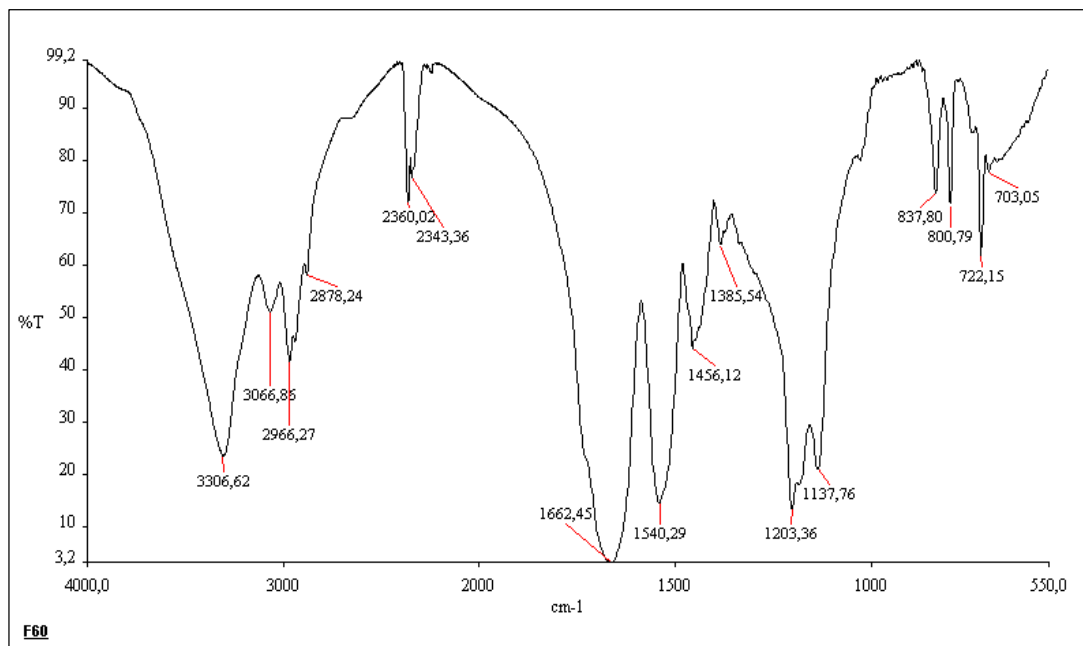
5.9. Espectro de la Fracción No.55, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



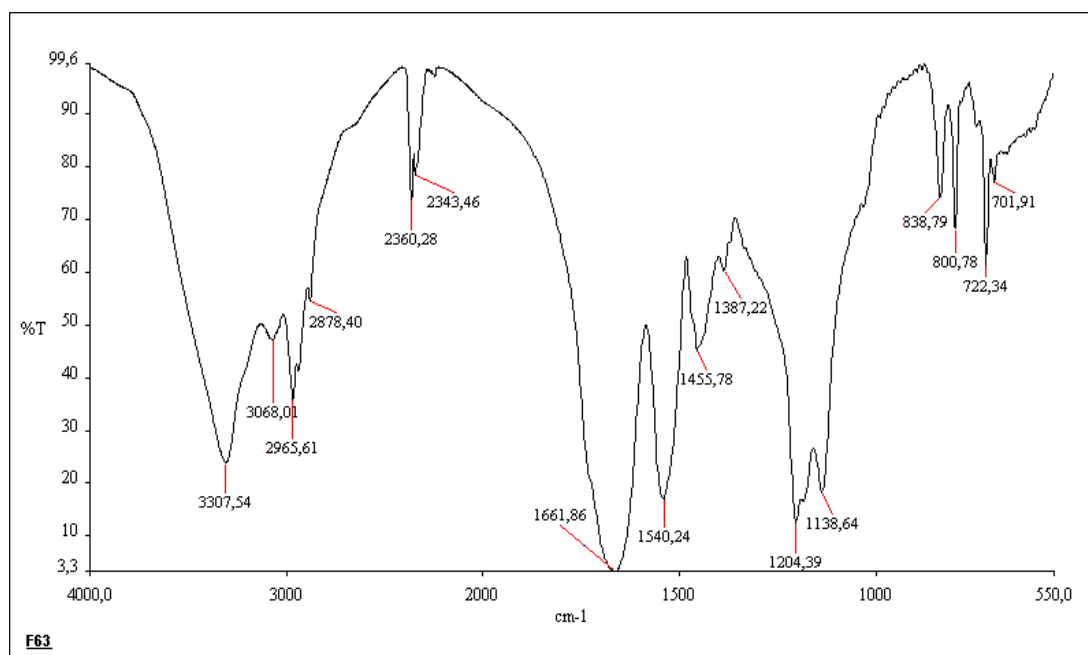
5.10. Espectro de la Fracción No.56, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



5.11. Espectro de la Fracción No.59, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



5.12. Espectro de la Fracción No.60, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.



5.13. Espectro de la Fracción No.63, pastilla con Bromuro de Potasio grado espectrométrico.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Ximena Elizabeth Dillon Maya, con cédula de identidad No. 171546886-2, autora del trabajo de graduación titulado: “Identificación de fracciones con actividad antimicrobiana obtenidas del exudado de la piel de *Agalychnis spurrelli* (Anura: *Hylidae*)”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS ESPECIALIDAD QUÍMICA ANALÍTICA** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 26 de abril de 2012

Srta. Ximena Elizabeth Dillon Maya

C.I.171546886-2